

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch)
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**Systematische Untersuchung zur Bestimmung maximal möglicher
Morphinkonzentrationen im Serum nach Konsum von Mohnsamen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Andrea Leinenkugel

Kiel 2010

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. jur. Kaatsch
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Herdegen
Tag der mündlichen Prüfung:	19.08.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel	19.08.2010

gez.

Systematische Untersuchung zur Bestimmung maximal möglicher Morphinkonzentrationen im Serum nach Konsum von Mohnsamen

Glossarium.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Prinzipielle Mohnproblematik im Hinblick auf verkehrsmedizinische Fragestellungen im Rahmen des § 24a StVG.....	3
1.2 Zielsetzung.....	5
2. Material und Methoden.....	6
2.1 Allgemeines.....	6
2.1.1 Morphin.....	6
2.1.2 Heroin.....	10
2.1.3 Codein.....	11
2.1.4 Morphingehalte in Mohnsamen.....	13
2.1.5 Prinzipien der Probenextraktion.....	16
2.1.6 Grundlagen der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC/MS)	17
2.2 Auswahl einer geeigneten Mohncharge mit hohem Morphingehalt.....	20
2.2.1 Material	20
2.2.2 Probenvorbereitung.....	23
2.2.3 Übersicht der Morphingehalte der zur Verfügung stehenden Mohnchargen.....	25
2.3 Validierung einer Methode zur Bestimmung von Morphin im Serum unter besonderer Berücksichtigung von niedrigen Konzentrationen.....	26
2.3.1 Eingesetzte statistische Verfahren.....	26
2.3.2 Zur Validierung eingesetztes Material.....	30
2.3.3 Probenaufarbeitung für die Methodenvvalidierung.....	32
2.3.4 Praktische Durchführung der Validierungsschritte	33
2.4 Systematische Untersuchung von Morphinkonzentrationen im Serum nach Mohnkonsum im Rahmen eines kontrollierten Essversuchs.....	35
2.4.1 Verwendetes Material.....	35
2.4.2. Vorbereitung des kontrollierten Essversuchs	36

2.4.3	Durchführung des kontrollierten Essversuchs.....	37
2.4.4	Probenaufarbeitung.....	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1	Ergebnisse der Validierung.....	40
3.2	Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Probanden des kontrollierten Essversuchs.....	43
3.3	Zeitlicher Verlauf der Konzentration von freiem Morphin im Serum.....	46
3.4	Weitere Daten zur Analyse der Morphinserumkonzentrationen	48
3.5	Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von absolut auf- genommenem Morphin.....	51
3.6	Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von relativ zum Körpergewicht aufgenommenem Morphin.....	52
3.7	Gesamtmorphin.....	53
3.8	Einfluss von Nahrungskarenz.....	57
3.9	Symptomatik.....	57
4	Diskussion.....	59
4.1	Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Wissens- standes vor Beginn des kontrollierten Essversuchs.....	59
4.2	Neue Erkenntnisse nach Abschluss des kontrollierten Essversuchs.....	62
4.3	Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse.....	64
5.	Zusammenfassung.....	76
6.	Literaturverzeichnis.....	78
7.	Anhang	
8.	Danksagung	
9.	Lebenslauf	

Glossarium

AUC	Fläche unter dem Grafen, engl.: area under the curve
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d3	3fach deuteriertes Molekül
eV	Elektronenvolt
G	Kanülengröße, engl.: „gauge“
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
h	Stunde/n
HPLC	high performance liquid chromatography (engl.)
i.D.	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
CYP 2D6	Cytochrom-P- 450 2D6
ISO	internationale Organisation für Normung (engl. International Organization for Standardization)
KG	Körpergewicht
6-MAM	6-Monoacetylmorphin
m	Masse
NWG	Nachweisgrenze
GTfCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

PFPA	Pentafluoropropionsäureanhydrid
PFPOH	2,2,3,3,3-Pentafluoropropanol
pKa	Säurekonstante
pH	„potentia Hydrogenii“, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p.a.	„pro analysis“
SIM-Modus	Selected Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
StVG	Straßenverkehrsgesetz
t	Tonnen
V(d)	Verteilungsvolumen
v/v	Volumenverhältnis
z	Ladung

1. Einleitung

1.1 Prinzipielle Mohnproblematik im Hinblick auf verkehrsmedizinische Fragestellungen im Rahmen des § 24a StVG

Mohnsamen (Semen Papaveris) sind die reifen Samen von *Papaver somniferum* L. (Schlafmohn), der zur Familie der Papaveraceae zählt. Die Samen sind schwarz, weiß, blau oder braun mit vielen Farbübergängen, sie sind 0,9 bis 1,5 mm lang und von nierenförmiger Gestalt [1].

Der weltweit erfolgende Anbau von *Papaver somniferum* dient neben der Samen- und Ölgewinnung zum Teil auch der Alkaloid- und Opiumherstellung. Opium wird durch Einritzen der unreifen Kapsel und Gewinnung des eingetrockneten, alkaloidhaltigen Milchsafte (Latex) gewonnen. Es enthält ca. 20-25% Alkaloide, von denen bisher etwa 50 Alkaloide in reiner Form isoliert wurden [1]. Morphin stellt das Hauptalkaloid des Rohopiums dar, das je nach Herkunft zu 7-20% in Opium vorhanden ist. Als weitere Alkaloide sind Codein (ca. 2%), Thebain (ca. 0,5%), Noscapin (ca. 5%), Narcein (ca. 0,5%) und Papaverin (ca. 1%) mengenmäßig von Bedeutung [2, 3]. Morphin und Codein sind Opiatanalgetika, Thebain ist ein Krampfgift, Papaverin ein Relaxans der glatten Muskulatur und Noscapin ein Antitussivum ohne nennenswerte zentrale Effekte [4]. Mohnsamen dienen in der Lebensmittelindustrie vor allem als Backzutaten und enthalten selbst fast keine Opiumalkaloide, können aber mit dem Milchsaft der Pflanze kontaminiert sein, was zu einer Aufnahme von Morphin und anderen Opiumalkaloiden mit der Nahrung führen kann.

Um dem Missbrauch seines zentralwirksamen Inhaltsstoffes Morphin vorzubeugen, wurde der Mohnanbau in Deutschland 1978 ins Betäubungsmittel-Gesetz einbezogen. Der Anbau von Schlafmohn ist derzeit nur noch auf kleinen Flächen mit betäubungsmittelrechtlicher Erlaubnis der Bundesopiumstelle des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte möglich und mit hohen Auflagen verbunden. Selbst der Anbau morphinarmer Sorten bedarf einer besonderen Genehmigung. Aus diesen Gründen wird der deutsche Mohnsamenbedarf für Back- und Speisezwecke von jährlich etwa 7000 bis 8000 t praktisch ausschließlich durch Importe gedeckt. Wichtigste Erzeugerländer sind die Türkei, Tschechien, Ungarn und Australien. Der

Handel mit Mohnsamen unterlag bis 2005 keinen Beschränkungen [5]. Im Dezember 2005 wurden die Mohnsamenhersteller vom Bundesamt für Risikobewertung (BfR) erstmals aufgefordert, die Gehalte aller pharmakologisch aktiven Opiumalkaloide in Mohnsamen auf das technologisch erreichbare Mindestmaß zu senken. Dabei wurde zwar betont, dass größte Anstrengungen von Seiten der Hersteller und Importeure unternommen werden sollten, jedoch wurden diese Qualitätskontrollen nur empfohlen und bleiben weiterhin optional [1].

Da die Mohnsamen ohne weitere Reinigung in Backwaren verwendet werden, kommt es bei deren Verzehr zur oralen Aufnahme von Alkaloiden wie Morphin und Codein. Das Phänomen, dass Mohnsamengenuss häufig zu positiven Opiat-Befunden im Urin führt, ist eingehend untersucht. Ob sich korrespondierend zu positiven Morphin-Befunden im Urin freies Morphin im Blut nachweisen lässt, wurde hingegen bislang kontrovers diskutiert.

Vor allem hätte ein Nachweis von freiem Morphin im Blut nach Verzehr mohnsamenhaltiger Lebensmittel erhebliche Auswirkungen im Hinblick auf §24a des Straßenverkehrsgesetzes (StVG). Danach handelt ordnungswidrig, wer unter der Wirkung von zum Beispiel Morphin oder Heroin im Straßenverkehr ein Kraftfahrzeug führt. Von einer Wirkung wird ausgegangen, wenn Morphin im Blut nachgewiesen wird. Es liegt dann keine Ordnungswidrigkeit vor, wenn Morphin aus der bestimmungsgemäßen Einnahme eines für einen konkreten Krankheitsfall verschriebenen Arzneimittels herrührt. Liegt keine ärztliche Verschreibung von Morphin oder dem zu Morphin verstoffwechselten Codein vor, kann somit derjenige geahndet werden, dessen freie Morphinkonzentration im Blut über der Nachweisgrenze des zur Bestimmung eingesetzten Verfahrens liegt.

Von der das Bundesministerium für Verkehr, Bau- und Wohnungswesen beratenden „Grenzwertkommission“, einem Gremium aus Toxikologen, Rechts- und Verkehrsmedizinern, wird zurzeit als Cut-Off-Wert für freies Morphin eine Konzentration von 10 ng/mL empfohlen, unterhalb dem keine Bestrafung – in der Regel eine Geldbuße, Fahrverbot und Punkte in der „Verkehrssünderdatei“ – erfolgen sollte.

Bisher wurden Serumkonzentrationen von Morphin und Codein nach Mohnkonsum noch nie systematisch untersucht. Da für Sanktionen nach §24a StVG der sichere Nachweis von freiem Morphin im Serum erforderlich ist und die Grenzwertkommission am 20.11.2002 den Grenzwert von 10 ng/mL empfohlen hat, war zu prüfen, ob nach Mohnsamenkonsum Morphinwerte oberhalb dieses Grenzwertes im Serum zu finden sein können.

Weiterhin war Anlass gegeben, sich mit der Mohnsamen-Problematik näher zu beschäftigen, da sich in Kiel positive Morphinbefunde im Urin häuften, die weder von Morphin-, Codein- noch Heroinaufnahme herrührten. Über das Bundesgebiet verteilt kam es zu Zwischenfällen mit teilweise ernsten gesundheitlichen Folgen und sozialrechtlichen Konsequenzen aufgrund von unbewussten Morphinaufnahmen durch Mohnsamenverzehr.

1.2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte systematisch überprüft werden, ob es nach exzessivem Mohnsamenkonsum zu eindeutig nachweisbaren Opiatbefunden in Serumproben kommen kann und welche Höhe die Serumkonzentrationen von Morphin erreichen können. Dies sollte unter verkehrsmedizinischen Aspekten erörtert werden, insbesondere im Hinblick auf § 24a des Straßenverkehrsgesetzes (StVG) und dem in diesem Zusammenhang empfohlenen Morphin-Grenzwert von 10 ng/mL Serum. Weiterhin sollte die Basis für eine Abschätzung des gesundheitlichen Risikos durch Verzehr morphinhaltiger Mohnsamen gelegt werden. Um diese Problematik eingehend zu untersuchen, sollte zunächst durch eine umfangreiche Basisvalidierung gezeigt werden, dass die eingesetzte Methodik im erwarteten Konzentrationsbereich ausreichend empfindliche und präzise Messungen zulässt. Daraufhin sollte eine Studie an einer Gruppe von 20 Probanden durchgeführt werden, in der Morphinkonzentrationen im Blut nach Aufnahme realistischer Mengen stark morphinhaltiger Mohnsamen über eine Zeitspanne von 24 h verfolgt werden. Zur Einordnung der Studie in die bereits bestehende Literatur sollten, soweit erhältlich, auch Morphinkonzentrationen in Urinproben bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeines

2.1.1 Morphin

Anwendungsbereiche

Morphin wird hauptsächlich oral oder parenteral zur Behandlung starker und stärkster Schmerzen (z. B. Karzinomschmerzen) eingesetzt. Es bewirkt eine Hinderung der Schmerzfortleitung sowie eine Veränderung der Schmerzverarbeitung. Weiterhin findet Morphin als Hypnotikum und in hohen Dosen als Anästhetikum Verwendung. Diese komplexe Wirkung ergibt sich aus der Interaktion von Morphin mit den Opioidrezeptoren in verschiedenen Bereichen des ZNS [4, 6].

Pharmakodynamik

Morphin besitzt zentrale Wirkungen mit spinalen und supraspinalen Angriffspunkten sowie periphere Wirkungen. Es bindet als exogener Ligand an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die auf verschiedenen Ebenen des ZNS sowie an Nervenzellen in der Peripherie wie z. B. im Darm zu finden sind. Für Morphin existieren drei klassische Rezeptortypen. Sie werden mit den griechischen Buchstaben μ , κ und δ bezeichnet. Durch die Bindung von Morphin an die μ -Rezeptoren entstehen zentrale Wirkungen wie Analgesie (überwiegend auf supraspinaler Ebene), Euphorie, Atemdepression, Miosis sowie eine antitussive Wirkung und Obstipation. Nach heutigem Wissensstand ist für die Analgesie ein anderer Rezeptorsubtyp (μ_1) verantwortlich als für die restlichen Wirkungen (μ_2). Eine Aktivierung der κ - und δ -Rezeptoren bewirkt eine Analgesie auf spinaler Ebene. Weiterhin sind die κ -Rezeptoren verantwortlich für Sedierung und Dysphorie.

Um das Wirkungsspektrum von Morphin besser darstellen zu können, wurde zwischen zentralen und peripheren Effekten unterschieden.

Nach Aktories et al. wird die Analgesie im Rückenmark (zentral) durch Hemmung der synaptischen Übertragung von den primär-afferenten nozizeptiven Fasern auf die Neurone des Tractus spinothalamicus erzeugt. Der Mechanismus dieser Hemmung schließt sowohl eine Verminderung der Freisetzung primär-afferenter Transmitter als auch eine Abnahme der Wirkung dieser Transmitter auf die nachgeschalteten

Neurone ein. Im Gehirn aktiviert Morphin deszendierende Bahnen, die die Erregungsübertragung in der ersten Synapse des nozizeptiven Systems hemmen. Zusätzlich wirkt Morphin an jeder weiteren Stelle der Schmerzverarbeitung (Thalamus, limbisches System) und ändert somit die emotionale und affektive Bewertung des Schmerzes [4].

Eine weitere zentrale Wirkung, die Euphorie, wird durch gesteigerte Dopaminfreisetzung im Nucleus accumbens ausgelöst. Der diagnostisch wichtigen Miosis liegt die Wirkung von Morphin auf den Edinger-Westphal-Kern zugrunde.

Die schwach antitussive Wirkung beruht auf einer Dämpfung der reflektorischen Erregbarkeit des Hustenzentrums.

Die durch Morphin ausgelöste Atemdepression kann bei gesunden Menschen mit niedrigeren Dosen verursacht werden, als bei Patienten, bei denen der Schmerz das Atemzentrum stimuliert [1]. Es kann schon nach therapeutischen Dosen eine Abnahme der Empfindlichkeit der Chemorezeptoren für den CO₂-Partialdrucks im Blut, einen potenten Atemstimulanten, festgestellt werden. Die Hemmung des Atemzentrums ist von der Dosis abhängig. Bei toxischen Dosen kann es zum Koma und Atemstillstand kommen [6].

Weitere zentrale Nebenwirkungen sind unter anderem Muskelrigidität, Krämpfe sowie Blutdrucksenkung und Bradykardie [4]. Andere häufig beobachtete, unerwünschte Wirkungen der Morphinapplikation sind anhaltende Mundtrockenheit, Übelkeit und Erbrechen.

Periphere Wirkungen zeigen sich durch verzögerte Magenentleerung, eine spastische Obstipation, Harnverhalt und eine Histaminfreisetzung, die unter anderem zu Juckreiz und Bronchokonstriktion führen kann [4].

Pharmakokinetik

Nach oraler Aufnahme wird Morphin rasch aus dem oberen Dünndarm und in kleinen Mengen auch aus dem Magen absorbiert. Die präsystemische Metabolisierung in der Darmmucosa und vor allem in der Leber (intestinaler und hepatischer first-pass-Effekt) liefert eine Bioverfügbarkeit oral verabreichten Morphins von 20-40 % [7, 8, 9, 10]. Das Wirkungsmaximum wird nach oraler Applikation eines schnell wirksamen Präparates frühestens nach 30-48 min [4, 11] erreicht. Morphin wird zu etwa 30 % an Plasmaprotein gebunden und verteilt sich im ganzen Körper mit einem Verteilungsvolumen V(d) von 2-5 L/kg. Die Plasmahalbwertszeit einer Einzeldosis von Morphin

beträgt 2-3 Stunden. Obwohl der primäre Wirkort von Morphin das Gehirn ist, überwindet es die Blut-Hirn-Schranke nur schlecht, da es zu 80 % in ionisierter Form vorliegt.

In Leber und Darm wird Morphin hauptsächlich zu Morphin-3-Glucuronid und in geringeren Mengen zu Morphin-6-Glucuronid metabolisiert, wobei Letzteres signifikant zur analgetischen Wirkung beiträgt. Ein weiterer aktiver Metabolit ist das Stoffwechselprodukt Normorphin, das eine schwache analgetische Potenz aufweist. Die Ausscheidung der Metaboliten erfolgt größtenteils über die Nieren (90 %), teilweise aber auch über Leber und Galle.

Dass für ältere Patienten niedrigere Morphindosen empfohlen werden, liegt an dem geringeren Verteilungsvolumen und der gesenkten Nierenfunktion. Morphin ist plazentagängig [7, 10, 12].

Nach der gesundheitlichen Bewertung des BfR vom 27. Dezember 2005 [1] wird Morphin auch in die Muttermilch ausgeschieden und erreicht dort höhere Konzentrationen als im mütterlichen Plasma. Da beim Säugling klinisch relevante Konzentrationen erreicht werden können, wird bei Morphintherapie vom Stillen abgeraten [7], bzw. es besteht eine strenge Indikationsstellung. Eine Schädigung des Säuglings nach therapeutischer Anwendung wurde aber bisher nicht bekannt, sodass bei einmaliger Applikation von Morphin eine Unterbrechung des Stillens in der Regel nicht für erforderlich gehalten wird [13]. Die American Academy of Pediatrics stellt fest, dass die Einnahme von Morphin üblicherweise mit dem Stillen vereinbar ist und weist ebenfalls darauf hin, dass keine Berichte über unerwünschte Effekte beim Säugling vorliegen, obwohl in seinem Blut messbare Morphingehalte auftreten können [12].

Toleranz und Abhängigkeit

Bei einer länger dauernden Zufuhr von Morphin kann sich eine Toleranz ausbilden, das heißt, es werden höhere Dosen notwendig, um den gleichen Effekt zu erhalten.

Treibende Kräfte bei der Entwicklung einer Sucht nach mehrmaliger Zufuhr sind der euphorisierende Effekt nach Opiat-Zufuhr (Initial-Rausch) sowie die Entzugssymptome nach Unterbrechung der Zufuhr bei bestehender Gewöhnung. Das Ausmaß des euphorisierenden Effekts hängt offenbar von der Geschwindigkeit des Anflutens des Opiats im Zentralnervensystem ab und ist dementsprechend bei intravenöser Zufuhr und guter „Liquor-Gängigkeit“ des Opiats besonders ausgeprägt.

Entzugssymptome beginnen entsprechend der Eliminationsgeschwindigkeit des betreffenden Opiats einige Stunden nach der letzten Gabe. Anschließend entwickeln sich psychische und vegetative Symptome wie Unruhe, Depression, Reizbarkeit, Schwäche, Diarrhöen, Kreislaufstörungen, Stenokardie, Erbrechen, Schwitzen und Tränenfluss [14].

Dosierung

Die üblich empfohlenen Dosierungen von oral verabreichtem Morphin werden in folgender Tabelle [7] erläutert. Jedoch ist grundsätzlich bei therapeutisch erwünschten Wirkungen und Nebenwirkungen von einer großen Schwankung der individuellen Empfindlichkeit auf Morphin auszugehen. Weiterhin wird in der Fachliteratur auf die Schwierigkeit hingewiesen, für Morphin eine Standarddosis festzulegen [1]. Die in Tabelle 1 angegebenen Dosierungen stellen Richtwerte da.

Tabelle 1: Empfohlene Einzel- und Tagesgesamtdosen für oral verabreichtes Morphin [7]

Alter bzw. (Körpergewicht)	Einzeldosis	Tagesgesamtdosis
Kinder bis 2 Jahre (bis 12,5 kg)	Bis zu 2,5 mg Morphinhydrochlorid entsprechend bis zu 1,9 mg Morphin	Bis zu 22,5 mg Morphinhydrochlorid entsprechend bis zu 17,1 mg Morphin
Kinder 2 - 6 Jahre (12,5 - 20 kg)	2,5-5 mg Morphinhydrochlorid entsprechend 1,9 - 3,8 mg Morphin	15-30 mg Morphinhydrochlorid entsprechend 11,4 - 22,8 mg Morphin
Kinder 6 - 12 Jahre (20 - 40 kg)	5-10 mg Morphinhydrochlorid entsprechend bis zu 3,8 - 7,6 mg Morphin	30-60 mg Morphinhydrochlorid entsprechend 22,8 - 45,6 mg Morphin
Jugendliche 12 - 16 Jahre (40 - 50 kg)	10-20 mg Morphinhydrochlorid entsprechend bis zu 7,6 - 15,2 mg Morphin	60-120 mg Morphinhydrochlorid entsprechend 45,6 - 91,1 mg Morphin
Jugendliche über 16 Jahre und Erwachsene	10-60 mg Morphinhydrochlorid entsprechend 7,6-45,6 mg Morphin	360 mg Morphinhydrochlorid entsprechend 273,3 mg Morphin

Die Wirkung einer Einzeldosis hält in der Regel 4 - 6 Stunden an [7, 8].

Patienten im höheren Lebensalter (im Regelfall ab 75 Jahre) können empfindlicher auf Morphin reagieren [2, 7, 8, 12]. Eine Dosisreduktion ist auch bei Nieren- und Leberinsuffizienz notwendig.

Von niedrigen Dosen ist jedoch nur eine Wirkung bei Opiumalkaloid-naiven Patienten, bei denen also nicht aufgrund vorhergehender Behandlung mit Opiumalkaloiden eine Toleranzentwicklung erfolgt ist, zu erwarten [1].

Es wird angenommen, dass die Pharmakokinetik von Morphin bei Kindern der der Erwachsenen ähnelt [12]. Neugeborene stellen jedoch eine Ausnahme dar, da sie aufgrund ihres unreifen P-450-Systems und der verminderten renalen Clearance eine verlängerte Halbwertszeit besitzen. Weiterhin könnte die unreife Blut-Hirn-Schranke bei ihnen zu erhöhten Morphinkonzentrationen im Gehirn führen. So zeigten Neugeborene auch bereits bei Morphindosen (bezogen auf kg Körpergewicht), die an Kinder sonst standardgemäß verabreicht werden, eine erhöhte Empfindlichkeit für Atemdepression und Krämpfe [12, 15, 16].

2.1.2 Heroin

Herstellung

Heroin wurde erstmals 1874 aus Morphin synthetisiert.

Heroin wird vorwiegend halbsynthetisch durch Acetylierung der aus Rohopium gewonnenen Morphin-Base hergestellt. Nach Einweichen und Filtration des Rohopiums unter Hinzufügung von Löschkalk und Ammoniumchlorid besteht der wichtigste Produktionsschritt in einer Acetylierung der so entstandenen Morphin-Base. Dies wird meist durch Verkochen der Morphin-Base mit Essigsäureanhydrid erreicht. Das nach der Acetylierung erhaltene Zwischenprodukt wird als Heroin-Base (Heroin Nr. 2) bezeichnet. Es folgen noch weitere Aufreinigungsschritte, bis letztendlich das Heroin (Diacetylmorphin) durch Natriumcarbonat ausgefällt wird. Der letzte Produktionsschritt besteht im Hinzufügen von Salzsäure zur Salzbildung (Heroin-HCl) und von Kalk während des Trocknens [17].

Pharmakokinetik

Durch die Acetylierung der Hydroxy-Gruppen des Morphins wird die Lipophilie der Substanz erhöht. Je lipophiler ein Stoff ist, desto leichter kann die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden, was zu einer schnelleren Anflutung im ZNS führt. Dies führt bei Heroin im Vergleich zu Morphin zu einem größeren Rauscheffekt und höheren Abhängigkeitspotenzial.

Im Blut wird Heroin über 6-Monoacetylmorphin (6-MAM) zu Morphin deacetyliert. Die erste Reaktion wird im Blut durch Esterasen katalysiert, die zweite Reaktion, also die Deacetylierung von 6-Monoacetylmorphin zu Morphin findet in der Leber statt [11]. Ebenfalls als ein Metabolit des Heroins ist Normorphin bekannt. Es entsteht jedoch nur zu einem geringen Prozentsatz (4 %).

Als Plasmahalbwertszeit für Heroin wird in der Literatur ein Wert von ca. 2-9 min nach intravenöser Applikation angegeben [18]. 6-Monoacetylmorphin wird anschließend durch Cholinesterase und spontane Hydrolyse zu Morphin deacetyliert. Der Nachweis von 6-MAM ist beweisend für den Heroinkonsum. Das Problem dabei ist dessen kurze Halbwertszeit im Serum von 7-34 min, sodass in der Praxis ein Heroinkonsum oft nicht mehr zu beweisen ist.

Da der Ausgangsstoff von Heroin, das Rohopium, auch Codein enthält, wird dieses bei der Herstellung ebenfalls acetyliert, sodass nicht aufgereinigtes Heroin stets auch Acetylcodein enthält, das zu Codein abgebaut wird. Nach Aufnahme von Straßenheroin findet sich somit auch Codein im Blut der Konsumenten.

2.1.3 Codein

Anwendungsbereiche

Codein ist ebenfalls ein Alkaloid aus dem Rohopium und wurde erstmals 1832 isoliert. Es handelt sich chemisch um Methyilmorphin. Codein wird gegen mäßig starke Schmerzen, gegen akute Diarrhö, vor allem aber zur symptomatischen Therapie von Reizhusten angewandt [4].

Pharmakodynamik

Codein hat opiatagonistische Eigenschaften. Es wirkt analgetisch, wobei es etwa 1/12 der schmerzstillenden Wirksamkeit von Morphin besitzt. Außerdem wirkt es durch Angriff am Hustenzentrum in der Medulla oblongata antitussiv, wobei dieser

Effekt wesentlich stärker ausgeprägt ist als beim Morphin. Weiterhin hat Codein leicht sedierende Eigenschaften. Die Wirkungen werden zum Teil über die Bindung an supraspinale μ -Rezeptoren vermittelt, wobei Codein eine außergewöhnlich niedrige Affinität zu den Opiatrezeptoren besitzt. Für einen großen Teil der Wirkungen ist der Metabolit Morphin verantwortlich [12, 19, 20].

Pharmakokinetik

Codein wird enteral gut resorbiert, wobei die maximale Plasmakonzentration nach etwa einer Stunde erreicht wird. Die Bioverfügbarkeit zeigt Schwankungen zwischen 40-70 %. Codein wird in der Leber hauptsächlich zu einem 6-Hydroxyglucuronid verstoffwechselt, 10-20 % des Codeins untergehen einer N-Demethylierung und bis zu 15 % werden in der Leber über das Iso-Enzym Cytochrom-P450- 2D6 (CYP 2D6) zu Morphin metabolisiert. Die Konzentration von Morphin im Serum ist dabei abhängig von der genetisch determinierten Enzymaktivität von CYP 2D6. Über 50 Mutationen des entsprechenden codierenden Gens sind dafür verantwortlich, dass CYP 2D6 in 5-10 % der europäischen Bevölkerung nicht exprimiert wird. Diese Gruppe kann Codein nicht adäquat verstoffwechseln und ist somit einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen ausgesetzt. Des weiteren sind Mutationen bekannt, bei denen eine Amplifikation bestimmter Bereiche des Gens zu einem extrem schnellen Metabolismus bei ca. 2-3 % der Bevölkerung führt. Hierbei wird Codein rasch zu Morphin metabolisiert, was ein Substanzspektrum im Serum entstehen lässt, das dem nach Heroinkonsum ähnelt [4].

Bei Personen mit normaler Metabolisierung können Codein, Morphin und Norcodein im Serum und Urin als reine Substanzen und konjugiert als Glucuronide nachgewiesen werden. Über 95 % einer Einzeldosis werden innerhalb von 48 Stunden mit dem Urin ausgeschieden.

Bei längerem und hoch dosiertem Gebrauch von Codein entwickeln sich Toleranz sowie physische und psychische Abhängigkeit. Die Gefahr einer Abhängigkeit ist im Vergleich zu Morphin jedoch gering.

Die unerwünschten Wirkungen des Codeins sind denen des Morphins ähnlich, jedoch in therapeutischen Dosierungen weniger ausgeprägt [1].

Dosierung

Die Einzeldosis für Erwachsene beträgt bei oraler Gabe von Codein als Antitussivum 10-20 mg (maximale Tagesdosis 120 mg) [1] und als Analgetikum 30-60 mg (maximale Tagesdosis 240 mg) [21]. Die niedrigste für Kinder in der Literatur genannte Einzeldosis beträgt 2,5 mg Codein für Kinder von 2-6 Jahren [1]. Als größte orale Einzeldosis für Kinder ab 12 Jahren und Erwachsene werden 0,1 g Codein angegeben [19, 20].

2.1.4 Morphingehalte in Mohnsamen

Die Erkenntnis, dass die in Bäckereiprodukten verwendeten Mohnsamen teilweise sehr große Mengen an Alkaloiden enthalten können, ist nicht neu.

Zahlreiche Studien zeigen, dass positive Nachweise von Opiaten in Urinproben stark abhängig sind vom Morphingehalt der aufgenommenen Mohnsamen. Schon seit 2002 wurden Chargen von Mohnsamen mit erhöhtem Alkaloidgehalt auf dem deutschen Markt gefunden, doch erstaunt die tatsächlich gemessene Varianz im Morphingehalt zwischen den verschiedenen Chargen.

1996 untersuchten Drasch et al. [22] in Deutschland erhältliche Mohnsamen und fanden in einer Charge Morphinwerte von 620 mg/kg Mohnsamen, allerdings war die Bestimmungsmethode (REMEDI, eine automatische HPLC) nicht für diese Bestimmung ausgelegt, sodass der Wert unter Vorbehalt betrachtet werden muss. Andresen und Schmoldt [23] sowie Fritschi und Prescott [24] fanden Morphingehalte von 206 bzw. 200 mg/kg in australischen Mohnsamen. Möller et al. [25] wiederum fanden sehr gering kontaminierte Mohnsamen mit Morphingehalten von 0,5 mg/kg. Das Herkunftsland war die Türkei.

Tabelle 2: Morphinkonzentrationen von Mohnsamenchargen aus unterschiedlichen Herkunftsländern

Herkunftsland	Morphingehalt (mg/kg)	Herkunftsland	Morphingehalt (mg/kg)
Unbekannt [22]	620	Unbekannt [24]	74
Unbekannt [26]	450	Unbekannt [36]	73,2
Unbekannt [27]	294	Unbekannt [36]	69,3
Spanien [28]	251	Osteuropa [25]	67
Australien [23]	206	Unbekannt [27]	63
Australien [24]	200	Unbekannt [35]	62,2
Unbekannt [24]	175	Unbekannt [33]	60,4
Unbekannt [29]	169	Spanien [24]	60
Indien [30]	167	Unbekannt [35]	58,4
Unbekannt [31]	164	Unbekannt [37]	58
Unbekannt [32]	151,6	Unbekannt [33]	51,6
Osteuropa [25]	151	Ungarn [28]	46
Australien [24]	120	Ungarn [24]	44
Australien [29]	108	Niederlande [30]	39
Australien [31]	107	Osteuropa [25]	39
Unbekannt [33]	107	Unbekannt [38]	33,2
Australien [34]	106	Unbekannt [26]	30
Niederlande [25]	100	Unbekannt [26]	29,5
Australien [28]	90	Unbekannt [27]	28
Unbekannt [33]	85,5	Türkei [28]	27
Unbekannt [35]	84,5	Niederlande [34]	19

Unbekannt [27]	17	Unbekannt [24]	4
Polen [24]	12	Niederlande [28]	4
Ungarn [24]	12	Polen [40]	2,7
Dänemark [24]	10	Unbekannt [33]	2,6
Dänemark [32]	8,4	Unbekannt [41]	2,1
Türkei [24]	8,0	Dänemark [26]	2
Unbekannt [36]	7,3	Tschechien [28]	2
Ungarn [32]	6,9	Unbekannt [42]	1,1
Türkei [34]	5,1	Ungarn [25]	1
Niederlande [24]	5	Türkei [32]	0,9
Türkei [28]	5	Türkei [32]	0,8
Unbekannt [39]	4,5	Asien [43]	0,6
Unbekannt [32]	4,1	Türkei [25]	0,5

Über die Ursachen für die derzeit hohen Morphinkonzentrationen in Mohnsamen lässt sich spekulieren. Da die Samen selbst nur minimale Mengen von Alkaloiden enthalten, können Morphin und Codein nur als äußere Kontamination an den Mohnsamen haften. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass durch Waschen von Mohnsamen der Morphingehalt der untersuchten Samen um mehr als 50 % verringert werden kann [27, 34, 39, 42, 44, 45]. Es sind hierzulande zwei Arten des Schlafmohns bekannt: der Schüttmohn und der Schließmohn. Beim Schüttmohn öffnen sich oben an der Kapsel unterhalb des Narbenkranzes kurz vor der Reife kleine Löcher, aus denen die Samen bei der Ernte ausgeschüttelt werden können. Beim Schließmohn hingegen bleibt die Kapsel geschlossen. Andresen und Schmoldt [23] erklären die erhöhten Morphingehalte in Mohnsamen mit einer neu aufgekommenen maschinellen Erntetechnik, bei der die Mohnkapseln gequetscht und dabei mit dem alkaloidhaltigen Milchsaft (Latex) kontaminiert werden können. Mit dieser Erntemethode werden höhere Erträge als beim Schüttmohn erzielt, bei dem die Samenkapseln per Hand oder maschinell ausgeschüttelt werden [46].

2.1.5 Prinzipien der Probenextraktion

In der toxikologischen Analytik kommt der Probenaufarbeitung eine entscheidende Bedeutung zu, da die in der biologischen Matrix in großen Mengen enthaltenen Bestandteile wie Fettsäuren und Eiweiße bei der chromatographischen Trennung stören und die spektroskopische Identifizierung der nachzuweisenden Substanzen erschweren können. Zudem liegen viele Substanzen in so geringen Konzentrationen in den Proben vor, dass sie vor ihrer Bestimmung angereichert werden müssen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren werden hier kurz näher beleuchtet.

Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das zugrunde liegende Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion - zum Beispiel mittels eines Scheidetrichters - ist, dass sich eine Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln verteilt. Die in den beiden Lösungsmitteln vorhandenen Anteile der gelösten Substanz stehen dabei entsprechend ihrer Löslichkeit in dem jeweiligen Lösungsmittel in einem dynamischen Gleichgewicht. Die gesuchte Substanz wird gewonnen, indem man das dynamische Gleichgewicht mehrere Male zwischen frischem Lösungsmittel und der zweiten alten Phase herstellt. Die alte substanzarme Phase wird nach ca. 3-4 Durchgängen verworfen und die Teile der substanzreichen Phase vereinigt.

Festphasenextraktion (engl.: „solid phase extraction“, abgekürzt: „SPE“)

Bei der Fest-Flüssig- oder Festphasenextraktion findet eine Adsorption der Substanz an die poröse Oberfläche einer festen Phase statt. Als feste Phase dienen unterschiedlich derivatisierte Kieselgele. Neben polaren und unpolaren Phasen werden auch Ionenaustausch- und Mischphasen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden Säulen mit Mischphasen verwendet, deren Oberfläche einerseits unpolare Oktylketten und andererseits Alkyl-Phenyl-Sulfonsäure (kationische Komponente) als Bindungsstellen enthalten. Über diese Bindungsstellen können Moleküle aus der flüssigen Phase pH-selektiv gebunden werden. Die Bindung an die feste Phase erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen (Oktylketten) bzw. über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Alkyl-Phenyl-Sulfonsäure. Es werden jedoch keine kovalenten Bindungen ausgebildet. Mit dieser Technik ist man in der Lage, unerwünschte Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen, entweder indem

man die Verunreinigungen an die feste Phase bindet und die gesuchte Substanz eluiert oder indem man die gesuchte Substanz bindet und dann in einem ersten Schritt die Verunreinigungen und im zweiten Schritt die gesuchte Substanz eluiert.

Bei der SPE werden zunächst die verwendeten Säulen konditioniert, um eine Benetzbarkeit zu gewährleisten. Nach Einstellung eines geeigneten pH-Wertes wird die Probe aufgetragen. Nach einem Waschschrift zum Entfernen von Verunreinigungen werden (im Idealfall) nur die Analyten eluiert. Zur Beschleunigung der einzelnen Schritte wird entweder ein Vakuum angelegt oder mit Überdruck gearbeitet [47].

2.1.6 Grundlagen der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer (Gaschromatographie-Massenspektrometrie, GC/MS) ist in der forensischen Chemie eine der leistungsfähigsten und die derzeit am häufigsten eingesetzte Methode. So wurden auch in der vorliegenden Arbeit alle Proben mittels GC/MS analysiert.

Die GC/MS eignet sich besonders zur empfindlichen Analyse von Verbindungen in komplexer Matrix. Die Verbindungen müssen hierbei unzersetzt in die Gasphase überführbar sein. Bei vielen polaren Substanzen ist es unerlässlich, sie vor der Injektion in den Gaschromatographen durch Derivatisierung in unpolare Verbindungen zu überführen.

Ein Gaschromatograph besteht aus einer druckkontrollierten Trägergasversorgung, dem Probeneinlass- und Verdampfungssystem (Injektor) und einer in einem Ofen befindlichen Trennsäule. Bei der hier verwendeten Kopplung des Gaschromatographen gelangen die aus der Trennsäule austretenden Substanzen direkt in ein Quadrupol-Massenspektrometer.

In der Trennsäule des Gaschromatographen dient ein Gas als mobile Phase, während ein Feststoff oder eine hochsiedende Flüssigkeit, die sich auf der Innenwand einer Trennsäule befindet, als stationäre Phase verwendet wird. Durch ein Phasengleichgewicht zwischen dieser stationären Phase und der mobilen Gasphase kommt es zur Auftrennung der Substanzen auf molekularer Ebene.

In der chemisch-toxikologischen Analyse werden heute praktisch ausschließlich Kapillarsäulen verwendet, die wegen ihres geringeren Platzbedarfs viel länger als gepackte Säulen sind und damit eine weitaus größere Trennleistung aufweisen. Kapillarsäulen bestehen aus amorph geschmolzenem Siliziumoxid und besitzen einen Innendurchmesser von 0,1 - 0,5 mm. Ihre Innenwand ist von einem 0,1 - 0,3 µm dicken Film einer hochsiedenden Flüssigkeit wie Polydimethylsiloxan oder Polyphenylmethylsiloxan überzogen.

Beim Eintritt in das Massenspektrometer werden die über die Säule getrennten Moleküle im Hochvakuum bei 10^{-7} Torr durch Elektronenbeschuss bei einer Energie von 70 eV ionisiert. Die hohe Überschussenergie führt zu einem Auseinanderbrechen der Moleküle und zu charakteristischen positiv geladenen Bruchstücken. Diese Ionen können dann nach ihrem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) aufgetrennt in ihrer Intensität gemessen werden.

Für ein Quadrupol-Massenspektrometer sind verschiedene Betriebsmodi möglich. Wird es im Full-scan-Modus betrieben, so werden vorgegebene Massenbereiche innerhalb eines gewissen Zyklus' Masse für Masse registriert und die jeweiligen Intensitäten gemessen. Durch die Darstellung der Ionenintensitäten auf einer m/z -Achse erhält man die vollständigen Massenspektren. Im sensitiveren SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) werden nur einzelne, für die Substanz charakteristische Ionen registriert. Hierbei wird die Empfindlichkeit der Messung auf Kosten eines Informationsverlustes erhöht.

Die Identifikation einer Verbindung erfolgt über das charakteristische Massenspektrum bzw. das charakteristische Ionenverhältnis bei SIM-Messungen, sowie zusätzlich über die Laufzeit auf der Trennsäule (Retentionszeit).

Um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen, wird eine definierte Menge eines internen Standards in den Proben mitgeführt. Dabei sollte der interne Standard ähnliche chemische Eigenschaften wie die gesuchte Substanz haben, um ein möglichst gleichartiges Extraktions-, Trenn- und Fragmentierungsverhalten sicherzustellen. Daher werden heute zumeist deuterierte interne Standards verwendet, in denen einzelne oder mehrere Wasserstoffatome der nachzuweisenden Verbindung durch Deuterium ersetzt sind. Deuterium ist ein Isotop des Wasserstoffs mit einem Proton und einem Neutron im Kern. Es ist doppelt so schwer wie Wasserstoff, dessen Kern nur aus einem Proton besteht. Der deuterierte interne

Standard besitzt daher eine höhere Molekülmasse bei sonst gleichen chemischen Eigenschaften wie die nachzuweisende Verbindung [47].

2.2 Auswahl einer geeigneten Mohncharge mit hohem Morphingehalt

2.2.1 Material

Zur Verfügung stehenden Mohnsamen und Mohnbackmischungen

Um für die Studien einen Mohn mit möglichst hohem Morphingehalt zu finden, wurden neun Mohnchargen aus unterschiedlichen Anbaugebieten auf ihre Morphin- und Codeinkonzentration hin untersucht.

Bei den im Raum Kiel erhältlichen Mohnsamenprodukten handelte es sich um Mohnbackmischungen der Kette „Hertie“ bzw. der Großbäckerei „Günther“.

Weiterhin wurden Bio-Mohnsamen der Einzelhandelskette „Reformhaus“ und der Kette „Sky“ auf ihren Opiatgehalt untersucht. Bei allen vier Mohnproben war das Ursprungsland unbekannt. Weiterhin waren ungarischer, tschechischer und türkischer Mohn sowie zwei australische Mohnchargen aus unterschiedlichen Regionen erhältlich.

Reagenzien

- Schwefelsäure p.a (Firma Merck)
- Schwefelsäure 2 normal
- Destilliertes Wasser (aus der Aufarbeitungsanlage des Hauses, 2. Reinheitsstufe)
- Natriumhydroxid p.a. (Firma Merck)
- Natriumhydroxidlösung 10 normal
- Kaliumhydroxid p.a. (Firma Merck)
- Chloroform (Firma Merck)
- Isopropanol/Chloroform-Mischung (10:90 v/v)
- Natriumcarbonat (Firma Merck)
- Natriumsulfat (wasserfrei, Firma Merck)
- Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat (Firma Merck)
- Essigsäureethylester p.a. (Essigester/Ethylacetat, Firma Merck)
- Kaliumdihydrogenphosphat (Firma Fluka)
- Methanol p.a (Firma Merck)
- Pentafluoropropionsäureanhydrid (PFPA, Firma Fluka)
- 2,2,3,3,3-Pentafluoropropanol (PFPOH, Firma Fluka)
- 2-Propanol p.a. (Firma Merck)

- Salzsäure p.a. (37%, Firma Merck)
- Salzsäure 2 normal
594 mL destilliertes Wasser wurden mit 146 mL konzentrierter Salzsäure vermischt
- Codein-hydrochlorid-dihydrat-d3 (Firma Sigma-Aldrich)
- Morphin-hydrochlorid-trihydrat-d3 (Firma Sigma-Aldrich)
- IS-Stammlösung für Morphin-d3 (228,3µg/ml)
0,6 mg Morphin-hydrochlorid-trihydrat-d3 in 2 mL Methanol gelöst
- IS-Stammlösung für Codein-d3 (242,0µg/ml)
0,6 mg Codein-hydrochlorid-trihydrat-d3 in 2 mL Methanol gelöst
- IS-Arbeitslösung mit Morphin-d3 (913ng/ml) und Codein-d3 (968 ng/ml)
Je 40 µL der IS-Stammlösungen von Morphin-d3 und Codein-d3 wurden auf 10 mL Methanol aufgefüllt
- Sörensen-Puffer (ph 7,6)
9,08 g Kaliumdihydrogenphosphat (Lösung A) und 11,88 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat (Lösung B) wurden in jeweils 1 L destilliertem Wasser gelöst. Davon wurden 13,2 mL der Lösung A mit 86,8 mL der Lösung B vermischt.

Geräte und Messparameter

- Automatisches Festphasenextraktionsgerät: Aspec XL-Work-up-device der Firma Gilson, Bad Camberg
- GC/MS: GC 6890 mit MSD 5973, Agilent, Waldbronn
- GC/MS Software: MSD Chemstation, Version D01.02.16
- Zentrifuge (Megafuge 10, Firma Heraeus, Hanau)
- Vibrationsmischer (Mona-Mixer, MM1, Firma Desaga GmbH Sarstedt-Gruppe)
- Waage (MC1, Analytic AC 210 S, Firma Sartorius)
- Mörser
- Druckluftbetriebene Abblasvorrichtung
- Regelbarer Heizblock

Zur Messung der Extrakte wurde das GC/MS unter folgenden Messbedingungen eingesetzt:

Trärgas Helium, konstante Flussrate 1,0 ml/min, druckprogrammiert,
 Injektionsvolumen 1 µL (splitless), Injektortemperatur: 250°C, Transferline: 280°C,
 Chrompack CP7860 Säule (CP-Sil 5 CB, 30 m, 250 µm i.D., 0.33 µm Filmdicke,
 Varian Darmstadt),

Temperaturprogramm: 80°C 1 min, 20°C/min bis 200°C, 10°C/min bis zur
 Endtemperatur 280°C, Haltezeit 10 min, Gesamtanalysendauer: 25 min;

Ionisationsenergie 70 eV.

Der GC/MS lief im SIM-Modus, es wurde nach Ionen mit folgenden Masse/Ladungs-
 Verhältnissen gesucht:

Tabelle 3: Ionen (Masse m/ Ladung z)

Substanz	Ionen (m/z)	Interner Standard	Ionen (m/z)
Codein	445, 446, 282	d3-Codein	448, 449, 285
Morphin	577, 414, 361	d3-Morphin	580, 417, 418

Hilfsmittel

Von der üblichen Ausstattung eines toxikologischen Labors wurden insbesondere folgende Hilfsmittel verwendet:

- 10 mL Schraubdeckelgläser (Pyrex) mit Teflondichtung
- Bond Elut Certify® Säulen, endcapped, 130 mg, 3 mL, Varian, Darmstadt
- 10 mL Spitzgläser
- Pipetten (5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL, Firma Biohit)
- Messkolben (10, 100, 1000 mL)
- GC-Gläschen mit Glaseinsätzen und Deckeln
- Verschiedene Glasgeräte (Bechergläser, Messzylinder etc.)
- Parafilm

2.2.2 Probenvorbereitung

Mohnsamen

Von den in Kiel erhältlichen Mohnsamenchargen der Ketten „Sky“ und „Reformhaus“ wurde jeweils eine Stichprobe entnommen. Ebenso wurde mit dem Mohn aus Ungarn, Tschechien und der Türkei verfahren. Jede Probe wurde zweimal mittels Festphase extrahiert und gemessen. Von beiden australischen Mohnchargen wurden jeweils 6 Stichproben entnommen und ebenfalls doppelt aufgearbeitet.

Pro Stichprobe wurden 0,5 g Mohnsamen in einem Mörser zerrieben und mit 2 mL einer 2 normalen Schwefelsäure in einem Schraubdeckelglas für 2 h bei 30°C inkubiert.

Das Gemisch wurde über einen mit Filterpapier ausgelegten Trichter in einen 20 mL Messkolben gefüllt und die abgefilterten Mohnsamen zweimal mit 0,5 mL der 2 normalen Schwefelsäure abgespült. Der pH-Wert wurde mit ca. 600 µL einer 10 normalen Natriumhydroxidlösung zwischen 7 und 8 eingestellt.

Anschließend wurde der Messkolben bis an die Messmarke mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Es wurden 0,5 mL dieser Lösung mit 50 µL deuterierten internen Standards (Codein-d3 und Morphin-d3) und 1 mL Sörensenpuffer versetzt und automatisch über eine Festphase (Bond Elut Certify®) extrahiert (siehe Kapitel 2.2.3).

Danach wurde der Extrakt eingedampft und für die Derivatisierung mit 40 µL PFPA und 20 µL PFPOH versetzt.

Das Reagenzglas wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen und für 30 min bei 65°C inkubiert. Die Lösung wurde eingedampft, in 15 µL wasserfreiem Essigester auf dem Vibrationsmischer gelöst und in GC/MS-Gläschen mit Einsatz pipettiert.

Mohnbackmischungen

Aus den Mohnbackmischungen „Günther“ und „Hertie“ wurden jeweils 2 Stichproben entnommen, die initial in einer 20-fachen und später mit einer 200-fachen Verdünnung aufgearbeitet wurden, um zuverlässige Ergebnisse zu bekommen.

Pro Stichprobe wurde 0,5 g Mohnbackmischung mit 3 mL methanolischer Kaliumhydroxidlösung in einem Schraubdeckelglas versetzt und bei 60°C für 2 h inkubiert. Gelegentliches Schütteln war notwendig, um das Anhaften der Mohnbackmischung an der Glaswand zu verhindern.

Nach Abkühlen wurde das Gemisch abfiltriert und in einem Becherglas mit 2,5 mL destilliertem Wasser verdünnt.

Der pH-Wert wurde mit 2 normaler Salzsäure auf 8,5 eingestellt und das Gemisch in einem Messkolben mit destilliertem Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Davon wurden 50 µL abgenommen und 50 µL des deuterierten internen Standards hinzugefügt. Das Gemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 2,5 mL aufgefüllt.

Die Lösung enthielt neben den gesuchten Alkaloiden auch Zucker, Süßmolkepulver, Milchfett, Mehl und noch weitere Backzutaten in gelöster Form. Zur Aufreinigung der Substanzen aus der wässrigen Lösung erfolgte eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 2,5 mL einer Isopropanol/Chloroform-Mischung (10:90 v/v). Die zwei Phasen wurden durch einen Scheidetrichter getrennt. Um die Ausbeute an Alkaloiden zu erhöhen, wurde die wässrige Phase insgesamt dreimal in analoger Weise extrahiert, anschließend wurden die organischen Phasen vereinigt, die wässrige Phase verworfen.

Die gesuchten Opiate wurden aus dem organischen Lösungsmittel durch dreimaliges Zusetzen von 2,5 mL der 2 normalen Salzsäure rückextrahiert. Die Salzsäureextrakte wurden in einem Becherglas vereinigt und mit Natriumcarbonatlösung auf einen pH-Wert von 9,5 eingestellt.

Wiederum wurden die gesuchten Substanzen durch Extraktion mit 2,5 mL der Isopropanol/Chloroform-Mischung in die unpolare Phase überführt. Der Vorgang wurde dreimal durchgeführt, die organischen Phasen vereinigt und die wässrige Phase verworfen. Zu der organischen Phase wurde wasserfreies Natriumsulfat gegeben, um den Wasseranteil zu eliminieren. Die Lösung wurde eingedampft und anschließend mit 1,5 mL Sörensenpuffer aufgenommen.

Es folgte eine in Kapitel 2.3.3 beschriebene automatisierte Festphasenextraktion.

Analog der Mohnsamenaufarbeitung wurde die Derivatisierung und die Messung mittels GC/MS durchgeführt.

2.2.3 Übersicht der Morphingehalte der zur Verfügung stehenden Mohnchargen

Die Mohnsamenproben der Kette „Sky“ und die der Kette „Reformhaus“ wiesen bei der Doppelbestimmung Morphingehalte von 7,6 mg/kg bzw. 1,1 mg/kg auf. Aufgrund der niedrigen Ergebnisse wurde keine zweite Stichprobe untersucht.

Die Mohnsamen aus Ungarn, Tschechien und aus der Türkei ergaben vergleichbar niedrige Werte, die zwischen 0,66 mg/kg und 13,2 mg/kg rangierten. Die Mohnsamenbackmischung der Bäckerei „Günther“ ergab einen Morphingehalt von 3,9 mg/kg, und die Backmischung von „Hertie“ hatte einen Morphingehalt von 7,5 mg/kg (Tabelle 2).

Zwei verschiedene Chargen von Mohnsamen australischer Herkunft vom Frühjahr/Sommer 2004 wiesen die höchsten Morphingehalte auf. Die erste Charge wurde direkt aus Australien importiert (Firma Spencers, Freemantle), die zweite stammte von einem Großhändler (Firma aga SAAT, Neukirchen-Vluyn).

Die Morphingehalte der verwendeten Mohnsamenchargen wurden nach Mahlen der Samen mit einem Mörser zu 72,4 mg/kg (erste Charge) bzw. 114,3 mg/kg (zweite Charge) bestimmt. Beide Mohnchargen wurden für den Mohnnessversuch verwendet.

Tabelle 4: Übersicht des Morphin- und Codeingehalts der 9 Mohnproben

Mohncharge	Morphinkonzentration [mg/kg]	Codeinkonzentration [mg/kg]
Türkei	0,66	nicht nachweisbar
„Reformhaus“	1,1	0,5
Ungarn	2,6	0,2
„Günther“ (Backmischung)	3,9	1,4
„Hertie“ (Backmischung)	7,5	1,5
„Sky“	7,6	2,5
Tschechien	13,2	1,6
1. australischer Mohn	72,4	3,4
2. australischer Mohn	114,3	13,1

2.3 Validierung einer Methode zur Bestimmung von Morphin im Serum unter besonderer Berücksichtigung von niedrigen Konzentrationen

Um die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgeworfenen Fragestellungen zu klären, musste zunächst gezeigt werden, dass die eingesetzte Methodik ausreichend empfindliche und präzise Messungen liefert. Dazu musste eine Basisvalidierung nach den Richtlinien der GTFCH durchgeführt werden.

2.3.1 Eingesetzte statistische Verfahren

Nach Schmitt et al. [48] gehört es zur Aufgabe eines jeden analytischen Labors, die Qualität der eingesetzten Analyseverfahren zu kontrollieren und zu dokumentieren. Erst dann kann von einem zuverlässigen Analyseverfahren gesprochen werden. Die Validierung der Methoden gehört damit zu den wichtigsten Aufgaben eines Labors. Dabei werden an ein forensisch-toxikologisches Labor wegen der Tragweite der Ergebnisse besonders hohe Ansprüche gestellt.

Allgemein versteht man nach der ISO 8402 unter Validierung sowohl den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode als auch die Bestätigung, dass eine Analysemethode die besonderen Forderungen für einen speziellen, vorgesehenen Gebrauch erfüllt. In der Regel werden hierfür a priori Akzeptanzgrenzen für bestimmte Parameter festgelegt, deren Erfüllung dann durch ein entsprechendes Versuchsprogramm überprüft wird. Die Validierung einer Methode entspricht somit einem Nachweis der Eignung einer Analysemethode für einen bestimmten Zweck. Zu Beginn der Validierung müssen einige Fakten bekannt sein.

Diese sind:

- die Anforderungen an die ermittelten Ergebnisse
- die erforderlichen Leistungsmerkmale
- das anzuwendende und dokumentierte Analyseverfahren

Grundsätzlich müssen nach der ISO 17025 alle nicht genormten, selbst entwickelten Verfahren, genormte Verfahren, die außerhalb ihres geplanten Einsatzgebietes eingesetzt werden, sowie Erweiterungen von genormten Verfahren validiert werden.

Die Ziele der Validierung sind:

- zu bestätigen, dass die Verfahren für den beabsichtigten Gebrauch geeignet sind
- aufzuzeigen, dass der Bereich und die Genauigkeit der mit dem validierten Verfahren erreichten Werte den Erfordernissen entsprechen
- die Validierung in dem Umfang durchzuführen, der zur Erfüllung der Erfordernisse der beabsichtigten Anwendung oder des betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist [48].

Für die statistische Auswertung der während der Validierung erhaltenen Daten wurde die unten beschriebene Computer-Software Valistat verwendet. Aus diesem Grund werden die verwendeten Grundbegriffe und Verfahren nur kurz erläutert:

Arbeitsbereich

Zu Anfang der Methodenvvalidierung werden der Arbeitsbereich und die Konzentrationen der Kalibratoren gemäß der Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) festgelegt. Die Arbeitsbereichsmittel orientiert sich hierbei an der am häufigsten zu erwartenden Probenkonzentration, wobei eine relativ gleichmäßige Verteilung der Kalibratorkonzentrationen über den Arbeitsbereich eine wesentliche Voraussetzung ist [48].

Es folgen der Grubbs-Test, der F-Test und der Mandel-Test:

Grubbs-Test auf Ausreißer

Ein gemessener Wert darf unter bestimmten Umständen vernachlässigt werden, wenn er unter statistischen Gesichtspunkten ein Ausreißer ist. Der Grubbs-Test ist eine Möglichkeit, Ausreißer zu identifizieren.

Dabei wird zunächst der Wert (x') mit der größten Abweichung vom Mittelwert (\bar{x}) bestimmt, die Differenz dieser beiden Werte zum Betrag genommen und durch die Standardabweichung (s) geteilt. Dieses Ergebnis (Prüfgröße oder PG genannt) wird mit in einer Tabelle aufgelisteten $r_m(P)$ -Werte verglichen, die vom Signifikanzniveau P und der Anzahl der Messwerte abhängen. P beschreibt dabei die statistische Sicherheit, mit der der Ausreißer als solcher erkannt werden soll. Im verwendeten

Verfahren war $P=99\%$. Ist die Prüfgröße größer als der korrespondierende $r_m(P)$ -Wert, handelt es sich um einen Ausreißer [48].

$$PG = \frac{|x' - \bar{x}|}{s}$$

F-Test prüft auf Homogenität

Mit diesem Test wird überprüft, ob zwei Varianzen, s_1 und s_2 , die auf der Basis von zwei Merkmalsergebnisreihen, die z. B. unter Vergleichsbedingungen ermittelt wurden, einer Grundgesamtheit entstammen. Sie werden also auf Gleichheit oder Homogenität getestet.

Überschreitet die Prüfgröße (PG) den F-Wert, wobei

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2},$$

entstammen die Varianzen verschiedenen Grundgesamtheiten, d. h. die Hypothese auf Gleichheit bzw. Homogenität muss verworfen werden.

Der theoretische F-Wert kann unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade der Verteilung und einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit α in einer F-Wert-Tabelle nachgeschlagen werden.

Linearitätstest nach Mandel (Mandel-F-Test)

Dieser Test hat gegenüber dem einfachen F-Test den Vorteil, dass die Prüfgröße nicht durch die Anzahl an Freiheitsgraden beeinflusst wird, was bei einer niedrigen Anzahl an Kalibrierdaten stark ins Gewicht fallen würde. Er kann aber nur bei gegebener Varianzhomogenität angewendet werden.

Genauigkeit

Die Genauigkeit beinhaltet die Richtigkeit, Wiederholpräzision und die Laborpräzision.

Die Richtigkeit wird in Form des systematischen Fehlers (Bias) ausgedrückt, was im Folgenden näher erläutert wird. Die Formeln für die Berechnung der Wiederhol- und

Laborpräzision finden sich im Anhang. Abweichungen von unter 15 % gelten jeweils als akzeptabel.

Test auf systematische Fehler (Bias)

Unter Bias versteht man in der Statistik den Unterschied zwischen Erwartungswert eines Schätzers und dem wahren Wert, den der Schätzer approximiert (oder einfacher ausgedrückt, die Differenz zwischen Messergebnis und Sollwert).

Der Bias errechnet sich aus dem Mittelwert aller Bestimmungen und dem Sollwert bei jedem Messpunkt nach folgender Formel:

$$Bias[\%] = \frac{\bar{X} - \mu}{\mu} \cdot 100$$

\bar{X} Mittelwert aller Bestimmungen
 μ Sollwert

Bias-Werte innerhalb eines Intervalls von +/- 15% wurden als akzeptabel betrachtet [47, 48].

Grenzwerte

Bei den Grenzwerten werden die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze unterschieden. Die Nachweisgrenze (NWG oder engl. LLOD) wird mit Hilfe des schwächsten Qualifier-Ions und die Bestimmungsgrenze (BG oder engl. LLOQ) mit dem Target-Ion bestimmt. Die Nachweisgrenze stellt den kleinsten Analytengehalt dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Leerwert unterscheidbar ist. Laut Richtlinien der GTFCh soll für die NWG eine Signifikanz von 90 % angenommen werden. Die Bestimmungsgrenze ist der kleinste Gehalt, der mit einer vorgegebenen Ergebnisunsicherheit (laut GTFCh 33 % bei einer Signifikanz von 99 %) bestimmt werden kann.

Wiederfindung

Um Aussagen zur Effektivität einer Extraktion zu machen, wird die Wiederfindung bestimmt. Bei der Wiederfindung wird die Extraktionsausbeute der gesuchten

Substanzen in dotierten Seren auf methanolische Standardlösungen bezogen. Die Wiederfindung sollte nach den GTFCh-Richtlinien mindestens 50 % betragen [48].

Ausschluss von Interferenzen

Durch die Analyse von Leerseren und mit internem Standard aufgestockten Leerseren kann nachgewiesen werden, dass bei den erwarteten Retentionszeiten der Substanzen keine Störsignale die Identifizierung und quantitative Bestimmung erschweren oder unmöglich machen.

2.3.2 Zur Validierung eingesetztes Material

Reagenzien

Bei der Methodenvvalidierung waren einige Reagenzien identisch mit denen der Mohnprobenaufarbeitung (2.2.1). Aus diesem Grund werden die in 2.2.1 aufgelisteten Basisreagenzien im Folgenden nicht mehr erwähnt.

- Morphin-hydrochlorid-trihydrat (Firma Merck)
- Codein-hydrat (Firma Merck)
- Stammlösung für Morphin (1 mg/mL)
13,3 mg Morphin-hydrochlorid-trihydrat wurden in 10 mL Methanol gelöst
- Stammlösung für Codein (1 mg/mL)
10,6 mg Codeinhydrat wurden in 10 mL Methanol gelöst.
- Arbeitslösung 1 mit Morphin und Codein (je 10 µg/mL)
Je 100 µL jeder Stammlösung wurde auf 10 mL Methanol aufgefüllt
- Arbeitslösung 2 mit Morphin und Codein (je 1 µg/mL)
1 mL von Arbeitslösung 1 wurde auf 10 mL Methanol aufgefüllt
- Arbeitslösung 3 mit Morphin und Codein (je 0,1 µg/mL)
1 mL von Arbeitslösung 2 wurde auf 10 mL Methanol aufgefüllt
- Ammoniaklösung (32%, Firma Merck)
- Isopropanol (Firma Merck)
- Dichlormethan (Firma Merck)
- Eluatmischung
Dichlormethan, Isopropanol und Ammoniak (32%) im Verhältnis 78:20:2
- Natriumacetat (Firma Merck)
- Essigsäure (100%, Firma Merck)
- Acetat-Puffer (pH 4,6)
25,5 mL einer 0,1 molaren Essigsäure wurden mit 24,5 mL der 0,2 molaren Natriumacetatlösung auf 100 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt
- Kontrollseren (Firma Medichem, Steinenbronn)

Geräte und Programme

- Zentrifuge (Megafuge 10, Firma Heraeus, Hanau)
- Vibrationsmischer (Mona-Mixer, MM1, Firma Desaga GmbH Sarstedt-Gruppe)

- Aspec XL, Aufarbeitungsgerät der Firma Gilson mit Bond Elut Certify-Säulen (endcapped, 130 mg, 3 mL, Varian, Darmstadt)
- Regelbarer Heizblock mit druckluftbetriebener Abblasvorrichtung
- Gaschromatograph/Massenspektrometer: GC/MS-Gerät der Firma Agilent, Waldbronn (GC 6890 mit MSD 5973)
- GC-Säulen: Chrompack CP7860 Säule (CP-Sil 5 CB, 30 m x 250 µm i.d., 0,33 µm Filmdicke, Varian, Darmstadt)

Die Darstellung der Chromatogramme und Massenspektren erfolgte mit der GS/MS-Software MSD Chemstation, Version D01.02.16.

Die Messbedingungen des GC/MS für die Methodenvvalidierung waren analog denen der Mohnaufarbeitung (Kapitel 2.2.1).

Die statistische Auswertung der Daten der Validierung wurde mit dem Programm Valistat 1.0 (Arvecon GmbH, Walldorf) durchgeführt.

Hilfsmittel

Die verwendeten Hilfsmittel entsprachen denen aus Kapitel 2.2.1.

Verwendetes Serum

Für die Methodenvvalidierung war ein Basisvorrat an Blutserum nötig. Dafür wurde jeweils 20 mL Blut von vier Mitarbeitern abgenommen. Die Blutproben wurden zunächst zentrifugiert, um das Serum zu gewinnen, welches bei -20°C gelagert wurde.

Mehrere Proben dieser vier Seren wurden an unterschiedlichen Tagen wiederholt über eine Festphase extrahiert und als Leerseren mittels GC/MS gemessen. Weiterhin wurde das Serum mit bekannten Mengen von Morphin, Codein und deren deuterierten internen Standards versetzt, über eine Festphase extrahiert und im GC/MS bestimmt.

Es wurde nach Störsignalen im Bereich der Retentionszeiten von Morphin, Codein und deren deuterierten Standards gesucht. Das beste Serum wurde als Grundserum für die Validierung ausgesucht. Der Blutdonor dieses Serums ließ sich in der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel 500 mL Blut abnehmen, welches vor Ort zentrifugiert und bei -20°C gelagert wurde.

2.3.3 Probenaufarbeitung für die Methodenvalidierung

Aufarbeitung der Serumproben

Nach dem langsamen Auftauen der Serumproben wurden jeweils 0,5 mL des Serums in Schraubdeckelgläser abgefüllt. Aufgrund der vorhandenen Probenplätze des automatischen Extraktionsgerätes konnten bis zu 20 Proben simultan aufgearbeitet werden. Die Mengen und Konzentrationen der zugesetzten Arbeitslösungen von Morphin und Codein waren abhängig von den vorgesehenen Kalibratorkonzentrationen. Es wurden jeweils 50 µL der deuterierten internen Standards von Morphin-d3 und Codein-d3 hinzugefügt. Nach Zugabe von 1 mL Sörensenpuffer wurde das Gemisch auf dem Vibrationsmischer geschüttelt. Anschließend wurde mit dem gepufferten Serum eine Festphasenextraktion durchgeführt.

Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion wurde auf dem Aspec XL Aufarbeitungsgerät der Firma Gilson mit Bond Elut Certify-Säulen durchgeführt. Die Säulen wurden zunächst mit 2 mL Methanol, dann mit 2 mL destilliertem Wasser und schließlich mit 1 mL Sörensenpuffer konditioniert. Es folgte die automatische Probenaufgabe. Als Nächstes wurde der pH-Wert mit 1 mL eines 0,1 molaren Acetat-Puffers (pH 4,6) umgestellt und anschließend wurden die Säulen mit 2 mL Methanol gewaschen. Die Säulen wurden getrocknet und mit 2 mL einer Dichlormethan/Isopropanol/Ammoniaklösung in Auffanggläser eluiert.

Das Eluat wurde bei 30 °C im Luftstrom eingedampft.

Derivatisierung

Zum Rückstand wurden 40 µL PFPA und 20 µL PFPOH zugegeben. Die Auffanggläser wurden mit Parafilm abgedeckt und die Proben bei 65 °C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte das Eindampfen bei 30 °C. Der getrocknete Rückstand wurde in 15-20 µL wasserfreiem Essigester aufgenommen, in ein GC/MS-Gläschen überführt und jeweils 1 µL jeder Probe in ein GC/MS-System injiziert.

2.3.4 Praktische Durchführung der Validierungsschritte

Arbeitsbereich

Um den Arbeitsbereich gemäß der Richtlinien der GTFCh festzulegen, wurden mindestens fünf dotierte Leerproben mit unterschiedlichen Konzentrationen je sechsmal extrahiert und gemessen.

Es wurde für Opiatkonzentrationen unterhalb von 20 ng/mL mit den Kalibratorkonzentrationen 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 20 ng/mL kalibriert. Für die Bestimmung der höheren Konzentrationen wurden Kalibratoren bis 1000 ng/mL verwendet (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ng/mL).

Genauigkeit

Im Anschluss wurde die Genauigkeit im unteren und oberen Arbeitsbereich (bei 10 und 50 ng/mL) durch Doppelbestimmungen zweier Proben an acht aufeinanderfolgenden Tagen getestet.

Dabei wurden die Richtigkeit, Wiederholpräzision und die Laborpräzision überprüft.

Grenzwerte

Im nächsten Schritt wurden die Grenzwerte bestimmt.

Die Nachweisgrenze wurde mit dem schwächsten Qualifier-Ion der jeweiligen Substanz bestimmt, wohingegen die Bestimmungsgrenze über das Target-Ion berechnet wird.

Tabelle 5: Ausgewählte Ionen der im Rahmen der Validierung untersuchten Substanzen und der dazugehörigen deuterierten internen Standards (Target-Ion standard und schwächeres Qualifier-Ion kursiv gedruckt)

Substanz	Ionen m/z	interner Standard	Ionen m/z
Codein	445 – 446	d3-Codein	448 – 449
Morphin	577 – 361	d3-Morphin	580 – 418

Wiederfindung (Extraktionsausbeute)

Für die Ermittlung der Extraktionsausbeute wurden methanolische Standardlösungen mit dotierten Seren verglichen. Die Leerseren wurden mit Substanzkonzentrationen im oberen und unteren Arbeitsbereich (4 ng/mL und 100 ng/mL) versetzt. Die methanolische Lösung wurde direkt, die dotierte Probe erst nach der Extraktion mit deuterierten internen Standards versetzt und derivatisiert. Die Ergebnisse von sechs Wiederfindungsmessungen wurden gemittelt. Die Wiederfindung sollte nach den GTFCh-Richtlinien mindestens 50 % betragen.

2.4 Systematische Untersuchung von Morphinkonzentrationen im Serum nach Mohnkonsum im Rahmen eines kontrollierten Essversuchs

20 freiwillige Probanden (A-T) nahmen an einem kontrollierten Essversuch teil, in dessen Verlauf sie größere Mengen stark kontaminierter Mohnsamen in Form von Mohnkuchen oder mit Milchreis verrührt aufnahmen.

2.4.1 Verwendetes Material

Zur Durchführung des Essversuchs verwendete Nahrungsmittel

- 1. australischer Mohn, Firma Spencers, Freemantle:
Morphinkontamination: 72,4 mg/kg
Das Mahlen der Mohnsamen erfolgte mit einer sauberen, elektrischen Kaffeemühle. Dieser Mohn wurde für die Probanden A-E (ersten fünf Probanden) verwendet.
- 2. australischer Mohn, Firma aga SAAT, Neukirchen-Vluyn:
Morphinkontamination: 114,3 mg/kg
Das Mahlen der Mohnsamen erfolgte mit einer Körnermühle der Kette „Körnermarkt“ in Kiel. Dieser Mohn wurde für die Probanden F-T verwendet.
- Kuchen: selbstgebackener Mohnkuchen mit 400 g gemahlene Mohnsamen pro Kuchen, sowie Butter, Zucker, Mehl und Milch (Backzeit: 1 h bei 160°C).
- Milchreis: kommerziell erhältlicher „Müllers Milchreis Original“ 250 g, eine Portion wurde mit jeweils 100 g gemahlenem Mohn versetzt.

Zur Durchführung des Essversuchs verwendete Hilfsmittel

Einige für den Essversuch verwendete Hilfsmittel wurden in vorigen Untersuchungen benutzt (Kapitel 2.3.2 und 2.2.1) und werden hier nicht weiter aufgelistet.

- Kanülen für S-Monovetten®, 20 G x 1 1/2", Sarstedt
- S-Monovetten®, 7,5 mL K3E, Sarstedt
- Kodan Tinktur forte, farblos, alkoholisches Hautantiseptikum, Schülke und Mayer GmbH, Norderstedt
- Mepore, 5x4 cm, Wundschnellverband
- Peha-soft, puderfreie Untersuchungshandschuhe aus Naturkautschuklatex
- Universal Urinbehälter, Sarstedt

Zur Probenaufarbeitung verwendete Reagenzien

Für die Probenaufarbeitung des Essversuchs wurden hauptsächlich die auch bei den vorigen Aufarbeitungen verwendeten Reagenzien (Kapitel 2.3.2 und 2.2.1) benutzt, welche im Folgenden nicht mehr erwähnt werden.

- Ammoniaklösung (25 %, Firma Merck)
- Trichloressigsäure p.a. (Firma Merck)
- Trichloressigsäure 10%

10 g Trichloressigsäure wurden auf 100 g mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Zur Probenaufarbeitung verwendete Geräte und Programme

Die für die Probenaufarbeitung verwendeten Geräte, deren Einstellungen und Messbedingungen sowie die verwendete Software waren identisch zu denen der Methodvalidierung (Kapitel 2.3.2).

2.4.2 Vorbereitung des kontrollierten Essversuchs

Ein Antrag an die Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur Genehmigung des Versuchs wegen möglicher Komplikationen im Zusammenhang mit insgesamt 100 Blutentnahmen wurde positiv beschieden.

Weiterhin wurde das Projekt vom „Bund gegen Alkohol und Drogen im Straßenverkehr“ (BADs) finanziell unterstützt.

Alle Probanden standen bis mindestens 8 h nach Verzehrende unter ärztlicher Aufsicht und wurden dazu verpflichtet, am Versuchstag kein Kraftfahrzeug zu lenken. Weiterhin wurden die Probanden schriftlich darauf aufmerksam gemacht, 14 Tage vor dem Versuch Mohnbackwaren, sowie codeinhaltigen Hustensaft oder Schmerzmittel zu vermeiden. Die Probanden wurden über die Studie informiert und auf mögliche Risiken hingewiesen. Es wurden Aufklärungs- und Konsensbögen an alle Probanden ausgeteilt, die unterschrieben von den Probanden zurückgegeben wurden.

Die oben genannten Formulare sind im Anhang wiedergegeben.

Nach Beer et al. [49] soll Mohn bei gefülltem Magen länger im Magen-Darm-Trakt verbleiben, was möglicherweise zu einem Anstieg der Resorptionsrate von Morphin

führt. Um den Einfluss des Füllungszustandes des Magens miteinzubeziehen, wurde die Hälfte der Probanden gebeten, vor der Mohnaufnahme zu frühstücken, die restlichen Probanden wurden angehalten, den Essversuch im nüchternen Zustand anzutreten.

Vor Beginn des Mohnsamenverzehr wurde von jedem Probanden eine Urinprobe abgegeben, um eine vorausgegangene Einnahme opiathaltiger Substanzen und damit eine Verfälschung der Proben auszuschließen. Weiterhin wurden von den Probanden das Alter, das Körpergewicht und die Körpergröße abgefragt.

Alle diese Daten wurden in einem Probanden-Erfassungsprotokoll von den jeweiligen Gruppenleitern dokumentiert. Dieses Protokoll umfasste weiterhin die Form und Zeitdauer der Mohnaufnahme, die Zeiten der geplanten Blutentnahmen und zufälligen Urinabgaben sowie die im Einzelfall beobachtete Symptomatik.

2.4.3 Durchführung des kontrollierten Essversuchs

Die Studie wurde mit insgesamt 20 freiwilligen Probanden durchgeführt, die an einem Vormittag innerhalb von maximal 90 min große Mengen stark mit Morphin kontaminierte australische Mohnsamen verzehrten. Es nahmen 12 Frauen und 8 Männer im Alter zwischen 19 und 45 Jahren (im Mittel 26 Jahre) teil. Die ersten fünf Probanden (A-E) nahmen im Rahmen des ersten Teils des Versuchs schwächer kontaminierte Mohnsamen auf als die Probanden F-T, da die stärker kontaminierte Mohnsamencharge erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung stand, eine möglichst hohe Exposition aber nur mit möglichst stark kontaminierten Mohnsamen zu erreichen war.

Der Mohn wurde in gemahlenem Zustand als Kuchen und mit Milchreis verrührt als Brei angeboten. Die Probanden mussten sich für eine dieser Aufnahmeformen entscheiden und sollten zügig möglichst viel dieser Produkte essen.

Ein Kuchen wurde jeweils mit 400 g gemahlenen Mohnsamen gebacken und in Vierteln dargereicht. Die Probanden wurden gebeten, mindestens ein Stück zu essen und damit 100 g Mohn aufzunehmen. Bei jedem weiteren angebrochenen Stück Kuchen wurde der aufgenommene Anteil durch Wiegen der nicht verzehrten Reste errechnet.

Als Alternative wurden jeweils 100 g gemahlene Mohnsamen mit einer Portion von „Müllers Milchreis“ (250 g) verrührt. Die Probanden wurden aufgefordert, mindestens eine solche Portion Milchreis zu essen und damit 100 g Mohn aufzunehmen. Bei nicht aufgegessenen Portionen konnte der übrig gelassene Anteil abgewogen und somit der aufgenommene Anteil kalkuliert werden.

Um den Versuchsablauf bei 20 Probanden reibungslos zu gestalten, wurden vier Probandengruppen gebildet, die jeweils einen Arzt oder Medizinstudenten als Gruppenleiter zugeteilt bekamen. Die Gruppenleiter nahmen selbst nicht am Versuch teil, sondern führten die Blutentnahmen durch und waren verantwortlich für die genaue Dokumentation der Ereignisse.

In dieser Studie sollte der Verlauf der Morphinkonzentration im Blut über 24 h untersucht werden. Die Blutproben wurden dementsprechend 1, 2, 4, 8 und 24 h nach jedem individuellen Verzehr abgenommen und der jeweilige Entnahmezeitpunkt dokumentiert. Es wurden keine Verweilkanülen verwendet, da diese in Vorversuchen häufig verstopften. Außerdem verließen die Probanden während der 24-stündigen Versuchsdauer das Institut, um alltäglichen Beschäftigungen nachzukommen, wobei Einzelpunktionen zu den vorgegebenen Zeiten besser toleriert wurden als Verweilkanülen.

Weiterhin wurden die Probanden aufgefordert, in den 24 h nach Mohnverzehr mindestens zwei Mittelstrahl-Urinproben abzugeben und deren Zeitpunkt zu dokumentieren.

Alle Blutproben wurden nach Versuchsende zentrifugiert und die gewonnenen Seren sowie die Urinproben bis zur späteren Analyse bei -20 °C tiefgefroren.

Insgesamt wurden von jedem Probanden fünf Blut- und - einschließlich der Leerprobe vor Versuchsbeginn - mindestens drei Urinproben entnommen.

2.4.4 Probenaufarbeitung

Die Proben aus dem kontrollierten Essversuch wurden auf freies Morphin und „Gesamtmorphin“ sowie auf freies Codein und „Gesamtcodein“ untersucht. Gesamtmorphin setzt sich zusammen aus dem Anteil des freien Morphins und dem mit Glucuronsäure konjugierten Anteil, der nach Hydrolyse mitbestimmt wird.

Die Untersuchung der Proben auf freie Opiate war analog der Probenanalyse der Methodenvalidierung: 0,5 mL Serum wurden mit 50 µL der deuterierten internen Standards (Codein-d3 und Morphin-d3) in einem Schraubdeckelglas versetzt. Nach Zugabe von 1 mL Sörensenpuffer wurde das Gemisch über eine Festphase extrahiert.

Im Gegensatz dazu mussten bei der Untersuchung auf Gesamtopiate die Glucuronide durch eine saure Hydrolyse gespalten werden. Dazu wurden 0,5 mL Serum nach Zugabe der deuterierten internen Standards mit 0,5 mL 10%iger Trichloressigsäure und 1,5 mL 2 molarer Salzsäure versetzt. Diese Mischung wurde intensiv auf dem Vibrationsmischer geschüttelt und bei 100°C für 45 min inkubiert. Mit 0,3 mL einer 25%igen Ammoniaklösung und 1 mL Sörensenpuffer wurde der pH-Wert auf ca 7,6 eingestellt und eine Festphasenextraktion durchgeführt.

Die Quantifizierung von freiem Morphin und Codein in den Serumproben wurde, sofern genügend Material vorhanden war, jeweils mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt, Gesamtmorphin und Gesamtcodein wurden jeweils in Einfachbestimmungen gemessen. Die Festphasenextraktion, Derivatisierung und die Messung mittels GC/MS wurden analog der Beschreibung in 2.3.3 durchgeführt.

3. Ergebnisse

Zunächst werden die Ergebnisse der Methodenvvalidierung dargestellt, um vorab zu zeigen, dass die eingesetzte Untersuchungsmethodik geeignet ist, kleine Konzentrationen von Morphin und Codein empfindlich und präzise zu messen. Denn nur unter dieser Voraussetzung kann die Fragestellung der vorliegenden Arbeit beantwortet werden.

3.1 Ergebnisse der Validierung

Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit der zur Quantifizierung von Morphin und Codein verwendeten Methode wurden die von der GTFCh vorgeschriebenen Validierungsschritte durchgeführt:

Ausschluss von Interferenzen

Durch die Analyse der Leerseren sowie der Nullproben (Serum plus internem Standard) wurde gezeigt, dass sich im Serum keine Substanzen befanden, die bei der verwendeten Aufarbeitung die Detektion der gesuchten Substanzen stören. Es fanden sich bei den erwarteten Retentionszeiten keine der zur Identifizierung und Quantifizierung verwendeten Ionen.

Linearität der Kalibration und Varianzenhomogenität

Es wurde für beide Opiate die Linearität innerhalb eines Bereiches von 0-1000 ng/mL gezeigt. Dies wurde mittels des Mandel-F-Tests mit einer Signifikanz von 99 % getestet. Die sechs durchgeführten Serien waren bezüglich ihrer Mittelwerte mit einer Signifikanz von 99 % homogen. Die Varianzenhomogenität wurde mit dem F-Test überprüft. Mit dem Grubbs-Test wurden Ausreißer eliminiert.

Genauigkeit

Die relative Standardabweichung für Wiederholpräzision und Laborpräzision bzw. der Bias für die Richtigkeit lag für die verschiedenen Analyten bei jeweils zwei Konzentrationen (10 ng/mL und 50 ng/mL) deutlich unter 15%. Somit wurden die an eine quantitative Bestimmungsmethode gestellten Akzeptanzkriterien erfüllt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Wiederhol-, Laborpräzision und Bias

Die Angaben zur Präzision werden als relative Standardabweichung (RSD) in % und die Richtigkeit als Bias ebenfalls in % angegeben; n = Anzahl der Messungen

	Wiederholpräzision (n=8) (% RSD)		Laborpräzision (n=8) (% RSD)		Bias (n=8) (%)	
	10 ng/mL	50 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL
Morphin	6,47	2,24	9,95	4,90	-5,19	-4,9
Codein	4,55	4,02	6,81	4,32	-10,0	-5,71

Grenzwerte

Die Richtlinien der GTFCh sehen für die Ermittlung der Nachweisgrenze (NWG oder engl. LLOD) ein Signifikanzniveau von 90 % und für die Bestimmungsgrenze (BG oder engl. LLOQ) ein Signifikanzniveau von 99 % vor. Dabei sollen Kalibratoren von 0, 10, 20, 30, 40 und 50 ng/mL eingesetzt werden. Damit ergaben sich die in Tabelle 7 aufgeführten Grenzwerte. Um die erwarteten sehr kleinen Morphin- und Codeinkonzentrationen quantitativ bestimmen zu können, wurde für Opiatkonzentrationen unterhalb von 20 ng/mL mit den Kalibratorkonzentrationen 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 20 ng/mL kalibriert. Von den Blutproben wurde jeweils eine Menge von 0,5 mL verwendet.

Mit den kleinen Kalibratorkonzentrationen ergaben sich Nachweisgrenzen für Morphin von 0,74 ng/mL und für Codein von 0,64 ng/mL sowie Bestimmungsgrenzen für Morphin von 2,82 ng/mL und für Codein von 2,60 ng/mL bei $k=3$ und einem Vertrauensintervall von 90% für die Nachweisgrenzen und 99 % für die Bestimmungsgrenzen (Tabelle 7).

Für die Bestimmung höherer Konzentrationen wurden zusätzlich Kalibratoren bis 1000 ng/mL verwendet (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ng/mL).

Zur Bestimmung der außerordentlich hoch konzentrierten Urinproben wurden dennoch nur Mengen von 5 μ L eingesetzt, um innerhalb des kalibrierten Bereichs zu bleiben.

Tabelle 7: Nachweisgrenzen (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) für Serumwerte < 20 ng/mL

	NWG in ng/mL	BG in ng/mL
Morphin (Kalibratoren nach GTFCh)	1,17	6,08
Morphin (kleine Kalibratoren)	0,74	2,82
Codein (Kalibratoren nach GTFCh)	0,94	7,30
Codein (kleine Kalibratoren)	0,64	2,60

Wiederfindung

Die gemittelten Wiederfindungsraten von 6 Wiederholbestimmungen von Morphin und Codein bei Konzentrationen von 10 ng/mL und 50 ng/mL finden sich in Tabelle 8. Bei Codein zeigten sich bei der niedrigen und der hohen Konzentration gemittelte Wiederfindungsraten deutlich über 50 %, bei Morphin war die gemittelte Wiederfindungsrate nur bei der hohen Konzentration so gut. Bei 10 ng/mL betrug sie nur 45,5 %.

In der Literatur werden auch Methoden mit Wiederfindungsraten unter 50 % als akzeptabel erachtet, sofern die angestrebten analytischen Grenzwerte erreicht werden [48], was in der vorliegenden Untersuchung der Fall war.

Die Validierung bestätigte die vorliegende Methodik als valides Instrument, niedrige Konzentrationen von Morphin und Codein nachzuweisen und zu quantifizieren.

Tabelle 8: Gemittelte Wiederfindungsraten (n=6) bei Substanzkonzentrationen von 10 und 50 ng/mL (Werte in Klammern geben die jeweilige Standardabweichung an)

Substanz	10 ng/mL	50 ng/mL
Morphin	45,5% (11,2 %)	77,6% (15,4 %)
Codein	61,2% (22 %)	81% (17,2 %)

3.2 Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Probanden des kontrollierten Essversuchs

Das Probandenkollektiv war mit 20 Versuchsteilnehmern das bisher größte, das an einem derartigen Versuch teilgenommen hat, dennoch war es zu klein, um statistische Betrachtungen an ihm durchführen zu können. Dafür konnten Einzelfallbetrachtungen angestellt werden, die bei einem größeren Kollektiv nicht möglich gewesen wären.

Die Versuchsvoraussetzung, nur Probanden ohne vorherige Opiataufnahme an dem Versuch teilnehmen zu lassen, wurde durch Urinproben bestätigt, die unmittelbar vor Versuchsbeginn abgegeben wurden und die sowohl ohne als auch nach Hydrolyse negativ auf die untersuchten Opiate waren.

In nachstehender Tabelle 9 sind die im Serum gemessenen Werte von freiem Morphin und Gesamtmorphin sowie von freiem Codein und Gesamtcodein zusammen mit den übrigen erhobenen Daten - mit Ausnahme der Symptomatik, die in Kapitel 3.8 aufgeführt wird - dargestellt.

Weiterhin sind in dieser Tabelle die gemessenen freien und Gesamtmorphinkonzentrationen im Urin bis zu 24 h nach Verzehrende aufgeführt, um die vorliegende Untersuchung im Vergleich mit anderen Studien, bei denen nur Urin gemessen wurde, einordnen zu können.

Die Werte für freies Morphin und Codein sind, sofern genügend Material vorhanden war, Mittelwerte von Doppel- oder Dreifachbestimmungen, Gesamtmorphin und Gesamtcodein wurden jeweils in Einfachbestimmungen gemessen.

Serumkonzentrationen von Codein und Morphin, die zwischen der Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen, wurden als positiv (pos) gekennzeichnet, Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden als negativ (neg) bezeichnet.

Proband	A			B			C			D			E		
aufgenommene Mohnmenge [g]	115			200			200			180			250		
Geschlecht / Alter [Jahre]	m / 26			m / 22			w / 24			m / 27			m / 22		
Körpergewicht (KG) [kg]	76			74			56			73			66		
Morphinaufnahme absolut [mg]	8,3			14,5			14,5			13,0			18,1		
Morphinaufnahme/KG [µg/kg]	109,6			195,7			258,6			178,5			274,2		
Nahrungskarenz vor Versuchsbeginn	nein			nein			ja			nein			ja		
Aufnahmedauer [min]	75			75			55			90			30		
Morphin im Blut [ng/mL]		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt
1 h nach Verzehrende		8,8	107		11,2	147		6,3	149		6,5	109		n.b.	124
2 h nach Verzehrende		8,1	113		6,3	108		5,3	139		8,3	126		7,1	128
4 h nach Verzehrende		4,7	81,2		8,7	353		4,9	n.b.		5,2	113		6,7	157
8 h nach Verzehrende		pos	60,9		3,4	91		pos	135		3,5	78,7		6,2	188
24 h nach Verzehrende		pos	10,3		neg	15,8		neg	n.b.		neg	3,7		pos	34,3
Codein im Blut [ng/mL]		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt
1 h nach Verzehrende		neg	pos		pos	5,0		pos	4,5		pos	4,5		n.b.	3,4
2 h nach Verzehrende		pos	4,8		pos	4,0		pos	4,3		pos	5,8		pos	4,0
4 h nach Verzehrende		pos	3,5		pos	n.b.		pos	n.b.		pos	5,5		pos	5,4
8 h nach Verzehrende		pos	4,3		pos	4,6		pos	5,2		pos	5,2		pos	8,2
24 h nach Verzehrende		neg	pos		neg	neg		neg	n.b.		neg	neg		neg	neg
Morphin im Urin [ng/mL]	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt
unmittelbar vor Versuchsbeginn		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg
x h:min nach Verzehrende	00:45	4741	47421	00:30	3848	36964	03:00	6321	12551	06:00	8394	160364	01:00	1642	7132
x h:min nach Verzehrende	02:00	11545	207888	06:00	4720	32541	07:00	6804	219648	12:00	5593	76760	24:00	8825	111107

Proband	F			G			H			I			J		
aufgenommene Mohnmenge [g]	100			125			100			150			100		
Geschlecht / Alter [Jahre]	w / 45			w / 24			w / 19			w / 25			w / 20		
Körpergewicht (KG) [kg]	85			75			60			65			70		
Morphinaufnahme absolut [mg]	11,4			14,3			11,4			17,1			11,4		
Morphinaufnahme/KG [µg/kg]	134,5			190,5			190,5			263,8			163,3		
Nahrungskarenz vor Versuchsbeginn	ja			ja			nein			nein			ja		
Aufnahmedauer [min]	20			45			25			45			15		
Morphin im Blut [ng/mL]		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt
1 h nach Verzehrende		4,2	13,7		11,4	274		5,7	51,2		11,9	86,1		6,1	24,7
2 h nach Verzehrende		5,4	41,1		9,8	187		4,9	68,3		10,9	106		8,9	68,6
4 h nach Verzehrende		4,0	76,8		7,8	130		5,7	82,8		9,7	63,2		7,8	75,9
8 h nach Verzehrende		3,5	100		3,4	63,4		pos	47,7		3,7	33,9		6,6	69,5
24 h nach Verzehrende		neg	60,8		pos	15,2		neg	18		neg	8,3		pos	12
Codein im Blut [ng/mL]		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt
1 h nach Verzehrende		neg	neg		pos	7,6		neg	pos		pos	n.b.		neg	pos
2 h nach Verzehrende		neg	pos		pos	5,1		neg	pos		pos	2,7		pos	pos
4 h nach Verzehrende		neg	pos		pos	4,5		pos	3,2		pos	pos		neg	pos
8 h nach Verzehrende		neg	3,9		neg	3,0		neg	pos		pos	pos		neg	pos
24 h nach Verzehrende		neg	3,0		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg
Morphin im Urin [ng/mL]	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt	Zeit x	frei	gesamt
unmittelbar vor Versuchsbeginn		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	neg
x h:min nach Verzehrende	01:15	1379	16147	01:40	17000	13106	02:10	2034	32395	01:45	14788	131651	02:00	1845	6580
x h:min nach Verzehrende	20:30	1644	24670	02:20	4708	20916	07:30	5105	5392	07:30	15101	215535	08:00	8885	79747
x h:min nach Verzehrende				24:00	2673	73490	24:00	540	6298		12:30	3084	82380		
x h:min nach Verzehrende											24:00	2338	30464		

[illegible]

Proband	P			Q			R			S			T			
aufgenommene Mohnmenge [g]	150			200			100			100			25			
Geschlecht / Alter [Jahre]	w / 22			m / 29			m / 27			m / 27			m / 25			
Körpergewicht (KG) [kg]	61			100			75			67			71			
Morphinaufnahme absolut [mg]	17,1			22,9			11,4			11,4			2,9			
Morphinaufnahme/KG [µg/kg]	281,1			228,6			152,4			170,6			40,2			
Nahrungskarenz vor Versuchsbeginn	ja			ja			ja			nein			ja			
Aufnahmedauer [min]	45			11			15			22			40			
Morphin im Blut [ng/mL]		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt	
1 h nach Verzehrende		10,2	54,8		17,3	146		5,0	35,4		3,7	13,8		pos	36,5	
2 h nach Verzehrende		13,6	71,3		13,8	252		7,6	69		6,3	31,8		pos	27,8	
4 h nach Verzehrende		13,6	109		11,3	294		4,9	89,5		9,4	74		pos	17,2	
8 h nach Verzehrende		7,0	59,5		8,3	114		3,0	49,7		3,8	73		neg	10,7	
24 h nach Verzehrende		pos	15		pos	9,3		neg	8,9		neg	14,1		neg	3,8	
Codein im Blut [ng/mL]		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt		frei	gesamt	
1 h nach Verzehrende		pos	pos		pos	3,8		neg	pos		neg	neg		neg	pos	
2 h nach Verzehrende		pos	pos		pos	7,8		pos	pos		neg	neg		neg	pos	
4 h nach Verzehrende		pos	3,3		pos	8,1		pos	2,8		neg	3,7		neg	pos	
8 h nach Verzehrende		pos	pos		neg	3,6		neg	pos		neg	2,9		neg	neg	
24 h nach Verzehrende		neg	neg		neg	neg		neg	neg		neg	pos		neg	neg	
Morphin im Urin [ng/mL]		Zeit x	frei	gesamt		Zeit x	frei	gesamt	Zeit x		frei	gesamt		Zeit x	frei	gesamt
unmittelbar vor Versuchsbeginn			neg	neg			neg	neg			neg	neg			neg	neg
x h:min nach Verzehrende		00:40	1856	7954		02:00	20759	175954	07:00		4296	95652		02:30	1379	6114
x h:min nach Verzehrende		02:20	3582	32911		24:00	3333	3387	09:00		3571	89299		05:00	4015	52625
x h:min nach Verzehrende		24:15	1474	20477					24:00		1304	20822				

In keiner Probe konnte freies Codein oberhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen werden. Die Werte lagen maximal zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze (d. h. zwischen 0,64 und 2,60 ng/mL), sodass keine zeitlichen Verläufe dargestellt werden konnten.

Die Konzentration von Gesamtcodein lag mit einem Maximalwert von 9,4 ng/mL in allen Fällen unterhalb von 10 ng/mL.

Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde aufgrund der hohen Morphinkonzentrationen im Urin jeweils nur eine sehr geringe Urinmenge eingesetzt, sodass für die Codeinkonzentrationen im Urin keine validen Ergebnisse erhalten werden konnten.

3.3 Zeitlicher Verlauf der Konzentration von freiem Morphin im Serum

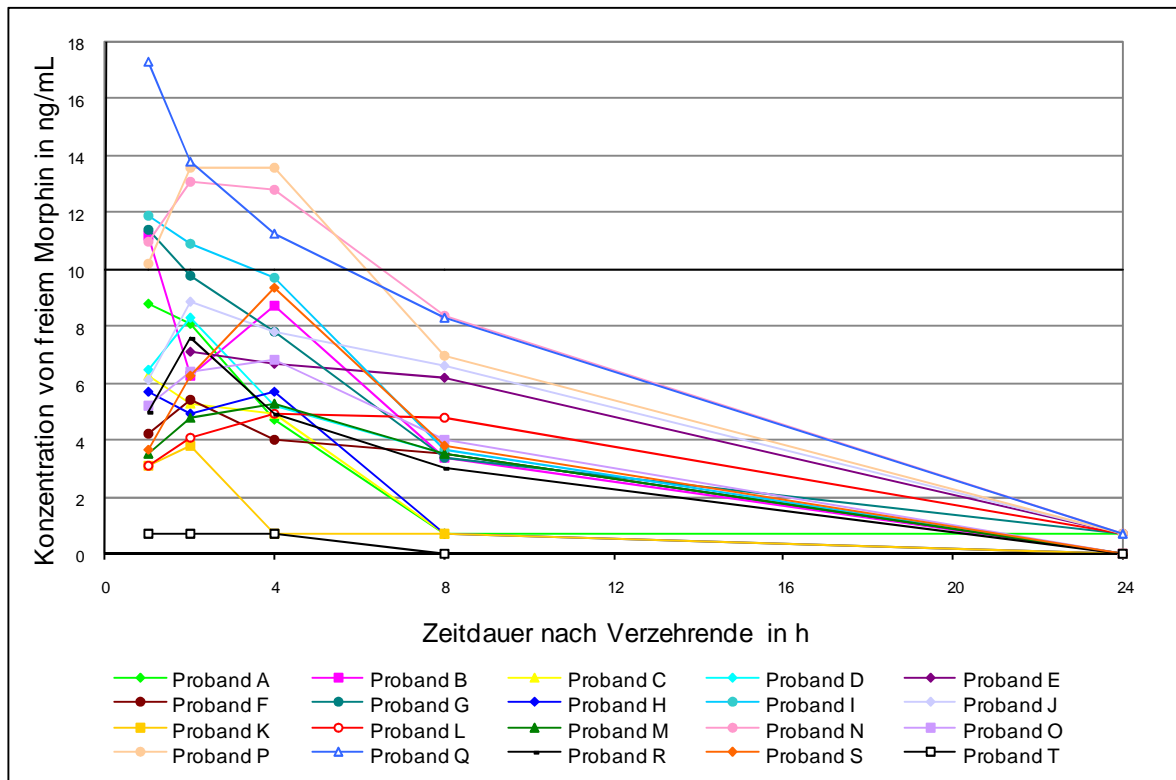


Diagramm 1: Konzentrationen von freiem Morphin im Blut bei 20 Probanden über einen Zeitraum von 24 h nach Verzehrende

Bei allen Probanden wurden Blutproben 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h nach Mohnsamenverzehr entnommen. Die Spitzenserumkonzentration von freiem Morphin wurde individuell unterschiedlich nach 1, 2 oder 4 h erreicht.

So wurde bei 6 Probanden in der ersten Blutprobe (1 h) die höchste freie Morphinkonzentration festgestellt, bei 7 Probanden in der zweiten Blutprobe (2 h) und bei 6 Versuchsteilnehmern in der dritten Blutprobe (4 h).

Weiterhin zeigte es sich, dass alle Probanden mindestens 8 h nach Verzehrende positiv auf freies Morphin waren. Lediglich ein Proband (T), der nur 25 g Mohnsamen aufgenommen hatte, zeigte immerhin 4 h nach Verzehrende ein positives Analyseergebnis auf freies Morphin (und Gesamtmorphin) im Serum.

6 Probanden (B, G, I, N, P und Q) zeigten bereits 1 h nach Verzehrende eine Serumkonzentration an freiem Morphin von mehr als 10 ng/mL (10,2 – 17,3 ng/mL). Nach 2 h zeigten 4 Probanden (I, N, P und Q) Werte zwischen 10,9 und 13,8 ng/mL,

und nach 4 h hatten immerhin noch 3 Probanden (N, P und Q) freie Morphinwerte im Serum von mehr als 10 ng/mL (11,3 - 13,6 ng/mL). Die Probanden mit Werten über 10 ng/mL hatten 125 g Mohn, d.h. über 14 mg Morphin, oder mehr aufgenommen.

Der Proband mit der höchsten Konzentration von 17,3 ng/mL im Blut (Kurve mit leeren Dreiecken) hatte 200 g Mohn entsprechend 22,9 mg Morphin aufgenommen. Ein Proband (Kurve mit leeren Kreisen) hingegen hatte fast die gleiche Menge, nämlich 175 g Mohnsamen mit 20 mg Morphin verzehrt, sein maximaler Wert lag jedoch unter 5 ng/mL. Die pro kg Körpergewicht aufgenommene Morphinmenge lag bei diesem Probanden mit 266,7 µg/kg sogar noch über der von dem Probanden mit der höchsten Blutkonzentration aufgenommenen Menge (228,6 µg/kg KG).

Bei 8 von 20 Probanden war freies Morphin im Serum selbst 24 h nach Verzehrende in Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze von 0,74 ng/mL und unterhalb der Bestimmungsgrenze von 2,82 ng/mL zu finden.

3.4 Weitere Daten zur Analyse der Morphinserumkonzentrationen

Ziel der Arbeit war es, systematisch zu untersuchen, ob es nach Mohnkonsum zu eindeutig nachweisbaren Opiatbefunden in Serumproben kommen kann und welche Höhe die Serumkonzentrationen von Morphin erreichen können. Dies sollte unter verkehrsmedizinischen Aspekten erörtert werden, insbesondere im Hinblick auf § 24a des Straßenverkehrsgesetzes (StVG) und dem in diesem Zusammenhang empfohlenen Morphin-Grenzwert von 10 ng/mL Serum.

In der vorliegenden Untersuchungen ergaben sich Serumkonzentrationen von freiem Morphin zwischen 10,2 ng/mL und 17,3 ng/mL bei 6 Probanden schon in der ersten Stunde nach Verzehrende.

Im Folgenden werden die Serumkonzentrationen von Morphin ins Verhältnis zu den oral aufgenommenen Morphinmengen gesetzt, wobei unterschiedliche Darstellungsformen gewählt werden.

Integrale „AUC“

Um von den Serumkonzentrationen auf die Gesamtmenge von freiem Morphin im Serum über die Zeitdauer des Versuchs schließen zu können, müsste die „Fläche unter dem Graphen“ (engl.: „area under the curve“, abgekürzt „AUC“) als das Integral einer zeitlichen Verlaufskurve (Diagramm 1) errechnet werden. Für diese Art der Darstellung lagen jedoch nicht ausreichend Messwerte pro Proband vor. Außerdem waren im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die maximal erreichbaren Morphinkonzentrationen im Serum von Interesse. Um jedoch trotzdem die Serumkonzentrationen im Verhältnis zur aufgenommenen Morphin- bzw. Mohnsamenmenge betrachten zu können, wurden verschiedene Mittelwerte von Morphinkonzentrationen betrachtet.

Mittelwert

Wie oben erwähnt, wurden die Serumspitzenkonzentrationen von freiem Morphin interindividuell verschieden nach 1, 2 oder 4 h erreicht. In keinem Fall überschritt die Morphinserumkonzentration nach 8 h die Morphinserumkonzentration nach 4 h.

Bei 25 % der Probanden konnten die Serumkonzentrationen von freiem Morphin nach 8 h nicht mehr quantifiziert werden. Nach 4 h existierten hingegen bei 90 % der Probanden noch messbare Konzentrationen von freiem Morphin. Somit reflektieren

die Morphinkonzentrationen im Serum 1 h, 2 h, 4 h und 8 h nach Verzehrende Momentaufnahmen des Verlaufs von Morphinabsorption im Darm, Metabolisierung sowie Ausscheidung, und die gemittelten Konzentrationen von freiem Morphin über die ersten 4 h können am besten verwendet werden, um Verhältnisse zwischen den Morphinserumkonzentrationen und den aufgenommenen Morphinmengen darzustellen.

Dieser Mittelwert der Morphinkonzentrationen über die ersten 4 h (abgekürzt als „4 h-Mittelwert“) dürfte mit dem AUC-Wert besser korrelieren als die absoluten Spitzenkonzentrationen.

Die „4 h-Mittelwerte“ für freies und Gesamtmorphin sind in Tabelle 10 zusammen mit der absolut und relativ zum Körpergewicht aufgenommenen Morphinmenge dargestellt.

Bei Proband T, der nur 25 g Mohnsamen verzehrt hatte, lagen die Serumkonzentrationen für freies Morphin nach 1, 2 und 4 h zwischen der Nachweis- und Bestimmungsgrenze (zwischen 0,74 und 2,82 ng/mL). In diesem Fall wurden ausnahmsweise die (vom Zahlenwert relativ unsicheren) gemessenen Werte gemittelt und mit ca. angegeben.

Tabelle 10: „4 h-Mittelwerte“ für freies und Gesamtmorphin sowie absolut und relativ zum Körpergewicht aufgenommene Morphinmenge für die einzelnen Probanden; der „8 h-Mittelwert“ des freien Morphins wird in Klammern angegeben. Dieser Begriff sowie die Begriffe „8 h-Mittelwert“ des Gesamtmorphins und „relative Morphinaufnahme“ werden in Kapitel 3.6 erklärt.

Proband	„4 h-Mittelwert“ („8 h-Mittelwert“) des freien Morphins (ng/mL)	„8 h-Mittelwert“ des Gesamt- morphins (ng/mL)	Absolute Morphin- aufnahme (mg)	Relative Morphin- aufnahme (µg/kg)
A	7,2 (-)	90,5	8,3	109,6
B	8,7 (7,4)	174,8	14,5	195,7
C	5,5 (-)	141	14,5	258,6
D	6,7 (5,9)	106,7	13,0	178,5
E	6,9 (6,7)	149,3	18,1	274,2
F	4,5 (4,3)	57,9	11,4	134,5
G	9,7 (8,1)	163,6	14,3	190,5
H	5,4 (-)	62,5	11,4	190,5
I	10,8 (9,1)	72,3	17,1	263,8
J	7,6 (7,4)	59,7	11,4	163,3
K	3,4 (-)	83,2	11,4	142,9
L	4,1 (4,2)	52,9	20,0	266,7
M	4,5 (4,3)	93,0	11,4	152,4
N	12,3 (11,3)	212,5	22,9	317,5
O	6,1 (5,6)	27,4	11,4	187,4
P	12,3 (11,1)	73,7	17,1	281,1
Q	14,1 (12,7)	201,5	22,9	228,6
R	5,8 (5,1)	60,9	11,4	152,4
S	6,5 (5,8)	48,2	11,4	170,6
T	ca. 1,2 (-)	23,1	2,9	40,2

3.5 Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von absolut aufgenommenem Morphin

In Diagramm 2 sind die „4 h-Mittelwerte“ der freien Morphinkonzentrationen eines jeden Probanden (in ng/mL) gegen die absolut aufgenommene Morphinmenge (in mg) aufgetragen.

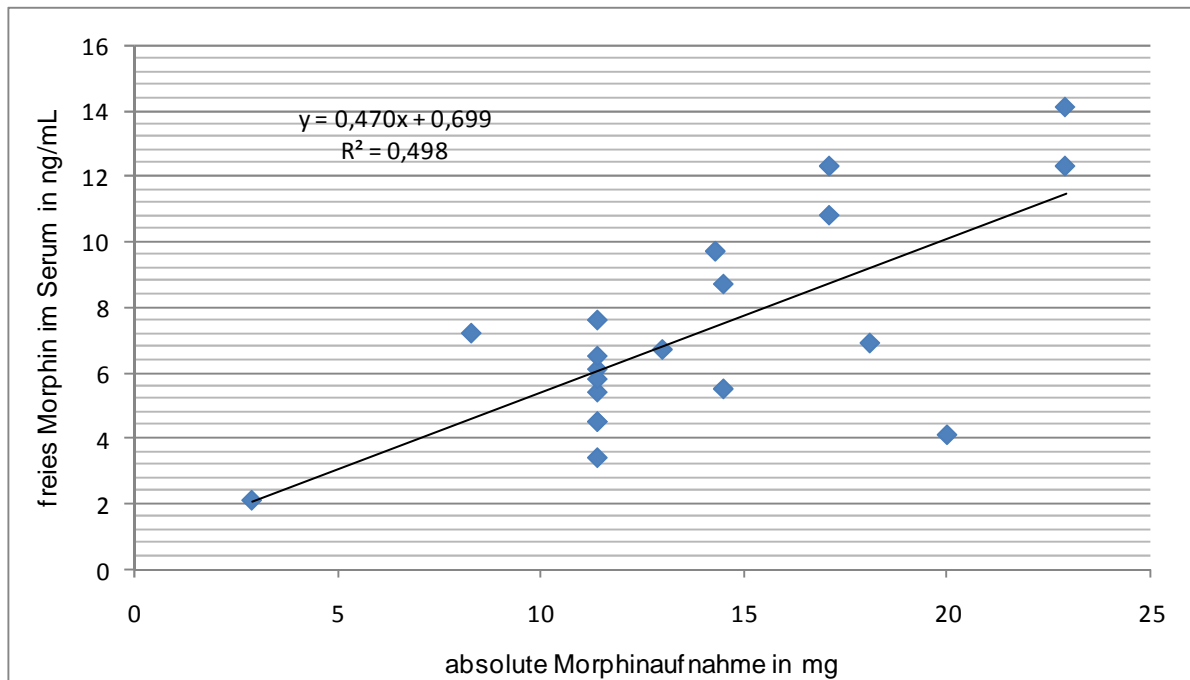


Diagramm 2: Konzentration von freiem Morphin („4 h-Mittelwert“) versus absolute Morphinaufnahme

Es zeigte sich keine eindeutige Proportionalität zwischen der absolut aufgenommenen Morphinmenge und der gemittelten Serumkonzentration (4 h-Mittelwert) des freien Morphins.

Mit $R^2 = 0,498$ war lediglich ein Trend zu erkennen.

3.6 Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von relativ zum Körpergewicht aufgenommenem Morphin

Im Hinblick auf die großen Differenzen des Körpergewichts der Probanden (zwischen 56 und 100 kg) wurde die individuell aufgenommene Morphinmenge auf das Körpergewicht des jeweiligen Probanden bezogen und als μg Morphin/ kg Körpergewicht (KG) angegeben (vgl. Tabelle 10).

In Diagramm 3 sind die „4 h-Mittelwerte“ der freien Morphinkonzentrationen des jeweiligen Probanden gegen die relative Morphinaufnahme pro kg KG aufgezeichnet.

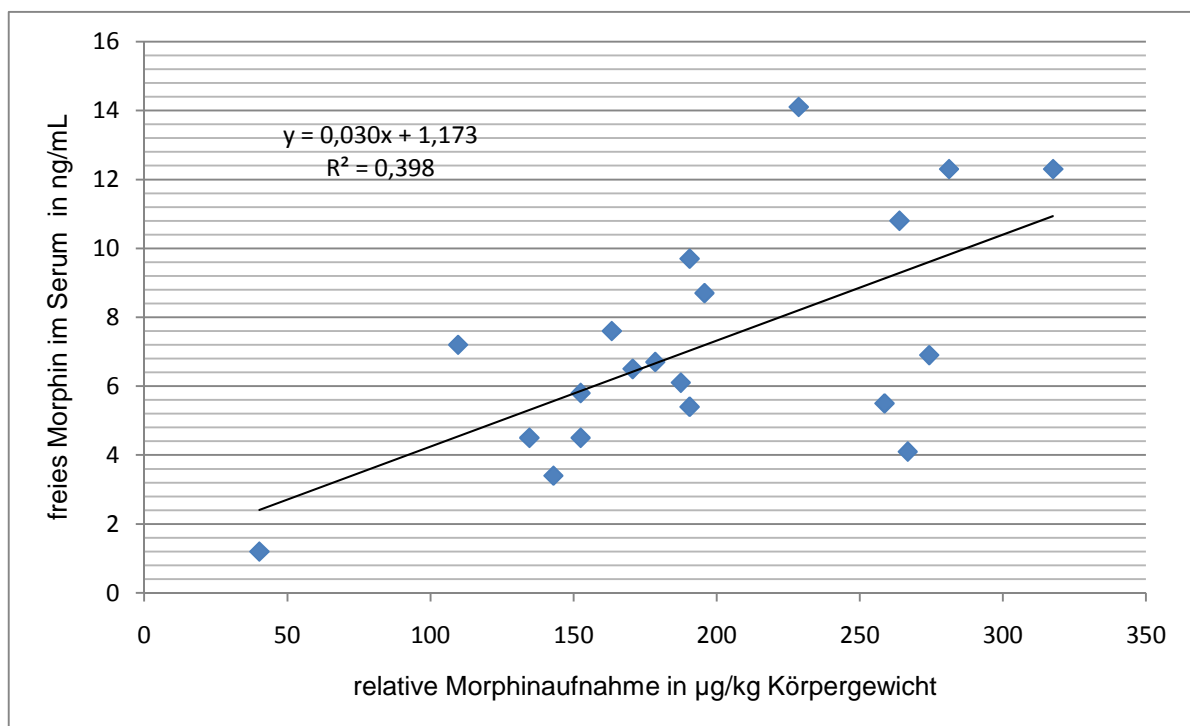


Diagramm 3: Konzentrationen an freiem Morphin („4 h-Mittelwerte“) gegen die relative Morphinaufnahme pro kg KG

Auch bei Bezug zum Körpergewicht zeigte sich keine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration an freiem Morphin im Serum und der konsumierten Menge von Morphin. Wiederum fand sich ein nicht streng proportionales Verhältnis zwischen den beiden Größen.

3.7 Gesamtmorphin

Das Gesamtmorphin stellt die Summe von freiem und konjugiertem Morphin dar. Bei oraler Aufnahme bildet der konjugierte Anteil des Morphins aufgrund eines hohen first-pass-Effekts den überwiegenden Anteil (70-80 %).

Da das zu einem geringen Prozentsatz gebildete Morphin-6-glucuronid (3-5 % der Morphinmetabolite) eine bis zu 10fach stärkere Wirkung als Morphin besitzt und damit klinisch von Relevanz ist, wurde neben dem freien Morphin auch das Gesamtmorphin betrachtet.

Im Folgenden wird dargestellt, wie die Konzentrationen des Gesamtmorphins mit der oralen Morphinaufnahme in Beziehung stehen und wie sich das Verhältnis von freiem zu Gesamtmorphin verhält.

Aus Tabelle 9 wird ersichtlich, dass bei allen Probanden, selbst bei Proband T, der nur 25 g Mohn aufgenommen hatte, sich Morphin nach Hydrolyse auch 24 h nach Verzehrende noch oberhalb der Bestimmungsgrenze im Serum nachweisen ließ.

Das Maximum für Gesamtmorphin trat bei den einzelnen Probanden zeitlich sehr unterschiedlich zwischen der ersten und achten Stunde nach Verzehrende ein. Die höchste Konzentration wies Proband B mit 353 ng/mL Gesamtmorphin nach 4 h auf. Nach 24 h betrug die maximal gemessene Konzentration noch 76,7 ng/mL (Proband K). Lag in den Blutproben eine Konzentration an Gesamtmorphin oberhalb von 100 ng/mL vor, so konnte - mit Ausnahme eines Falles (Proband A, Probe nach 1 h) - in den betreffenden Proben auch Gesamtcodein oberhalb der Bestimmungsgrenze von 2,60 ng/mL detektiert werden.

Um eine durchschnittliche Serumkonzentration für jeden Probanden zu erhalten, wurden, ähnlich wie bei den Konzentrationen von freiem Morphin die Serumkonzentrationen des Gesamtmorphins über die ersten 8 h nach Verzehrende gemittelt (abgekürzt als „8 h-Mittelwerte“). Bei der Abschätzung der durchschnittlichen Konzentration von Gesamtmorphin wurden, im Gegensatz zu freiem Morphin, die ersten 8 h betrachtet, da bei 4 Probanden (E, F, L, M) noch in der achten Stunde nach Verzehrende Spitzenwerte von Gesamtmorphin auftraten.

Eine Übersicht dieser Daten ist Tabelle 10 zu entnehmen. Die gemittelten „8 h-Werte“ der Gesamtmorphinkonzentrationen wurden in dem nachstehenden Diagramm 4 jeweils gegen die relativen Morphinaufnahmen pro kg Körpergewicht aufgezeichnet.

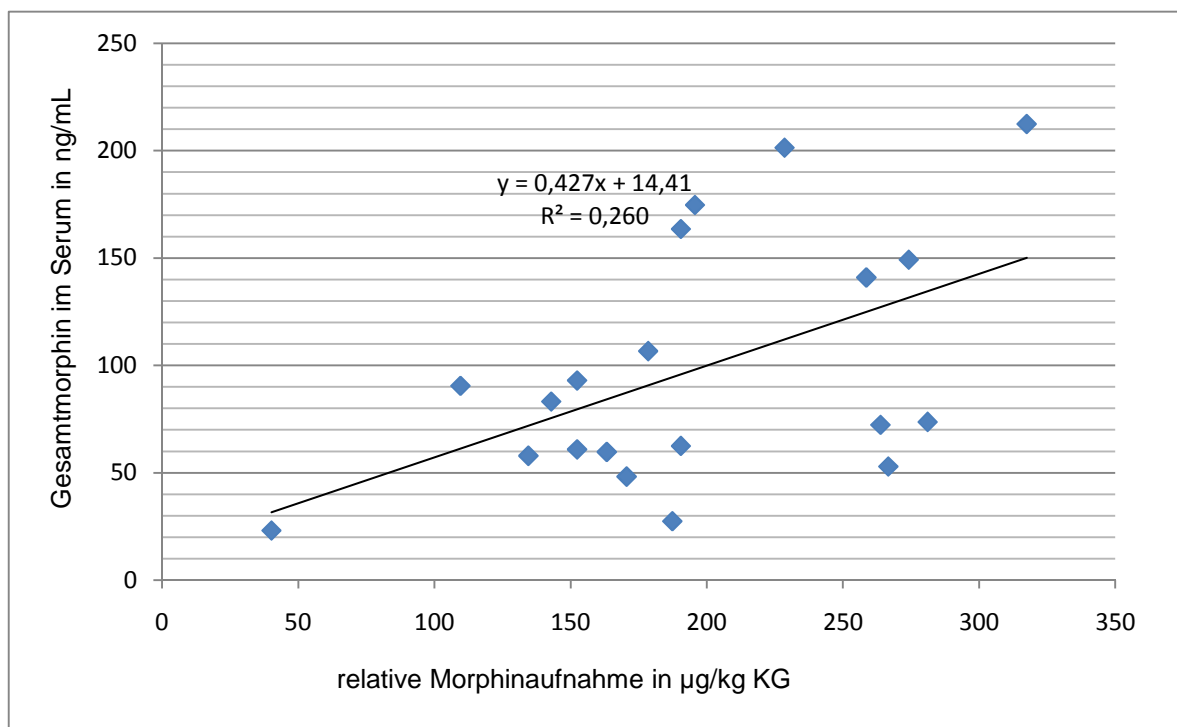


Diagramm 4: Abhängigkeit der „8 h-Mittelwerte“ der Konzentrationen an Gesamtmorphin (in ng/mL) von der relativen Mohnaufnahme (in µg/kg).

Es zeigte sich, dass keine direkte Proportionalität zwischen diesen zwei Größen bestand mit $R^2=0,260$.

Weiterhin wurde das Verhältnis von freiem Morphin zu Gesamtmorphin betrachtet. Um den Anteil von freiem Morphin an Gesamtmorphin zu ermitteln, wurde auch bei den freien Morphinkonzentrationen der „8 h-Mittelwert“ errechnet und im folgenden Diagramm 5 dargestellt. Bei 5 Probanden (A, C, H, K und T) konnte kein „8 h-Mittelwert“ gebildet werden, da nach 8 h freies Morphin zwar (mit Ausnahme von Proband T) nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht zu quantifizieren war. Somit wurden diese Probanden nicht in Diagramm 5 miteinbezogen.

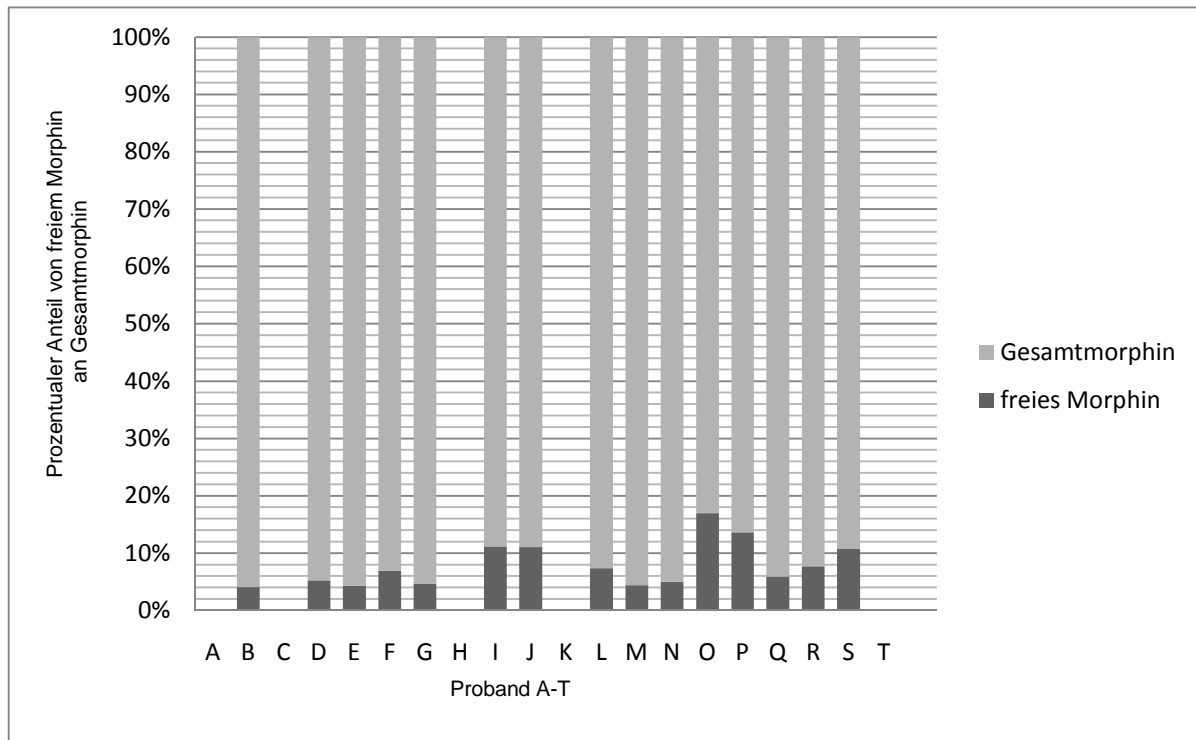


Diagramm 5: Darstellung des prozentualen Anteils von freiem Morphin an Gesamtmorphin

Hier wurde die Gesamtmorphinkonzentration („8 h-Mittelwert“) gleich 100 % gesetzt, um jeweils den prozentualen Anteil der daran gemessenen freien Morphinkonzentration („8 h-Mittelwert“) zu verdeutlichen. Die tabellarische Auflistung der Werte wurde aus Tabelle 10 entnommen.

Hieraus lässt sich erkennen, dass die gemittelten „8 h-Mittelwerte“ des freien Morphins nur knapp 20 % der Werte des Gesamtmorphins erreichten.

Als Nächstes wurde das Verhältnis der Konzentrationen an freiem Morphin („8 h-Mittelwerte“) zu Gesamtmorphinkonzentrationen („8 h-Mittelwerte“) in absoluten Zahlen zueinander ins Verhältnis gesetzt (Diagramm 6).

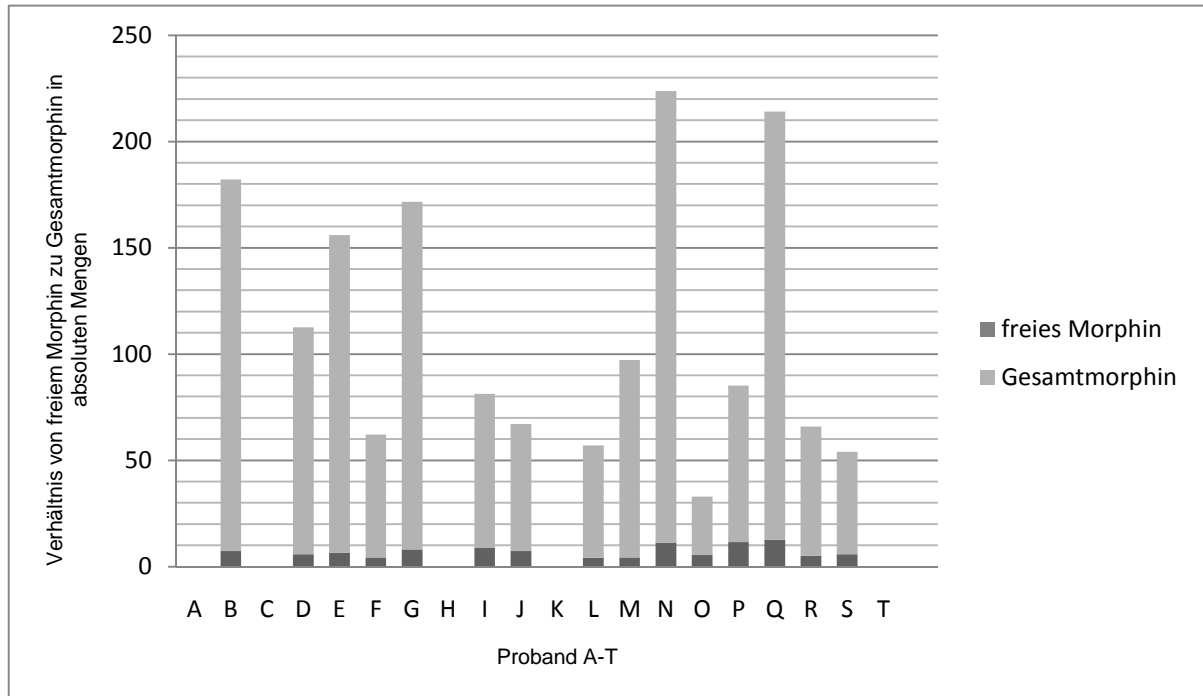


Diagramm 6: direktes Verhältnis von freiem Morphin zu Gesamtmorphin in absoluten Mengen

Hier wurden die absoluten Konzentrationen gegeneinander aufgetragen, um zu verdeutlichen wie stark die Konzentrationen von Gesamtmorphin interindividuell schwankten.

Die Probanden mit (aus Diagramm 5 erkennbaren) höheren prozentualen Anteilen an freiem Morphin (I, J, O, P, S), hatten im Durchschnitt niedrigere Gesamtmorphinkonzentrationen im Serum.

3.8 Einfluss von Nahrungskarenz

Die Hälfte der Versuchsteilnehmer wurde gebeten, den Mohnversuch mit nüchternem Magen anzutreten.

Die übrigen Probanden nahmen ein Frühstück maximal 2 h vor Beginn des Mohnverzehr zu sich.

Es ergab sich, dass eine zuvorige Nahrungsaufnahme bzw. Karenz weder die Höhe noch das zeitliche Auftreten der Spitzenwerte beeinflusste.

3.9 Symptomatik

Die im Versuch geschilderte Symptomatik nach dem Mohnsamenverzehr stellte sich wie folgt dar: Die niedrigste Morphindosis, bei der über unerwünschte Wirkungen, nämlich Kraftlosigkeit und Müdigkeit, berichtet wurde, lag bei Proband T, der nur 25 g Mohnsamen essen wollte. Er hatte eine Mohnaufnahme von nur 2,9 mg absolut und 40,2 µg/kg KG. Aufgrund der niedrigen Mengen ist anzuzweifeln, ob die Symptome auf die Wirkung der Mohnsamen zurückzuführen sind.

Bei der nächsthöheren Morphinaufnahmemenge von 8,3 mg absolut, entsprechend 109,6 µg/kg KG, bemerkte Proband A keine unerwünschten Wirkungen.

Es nahmen 8 Versuchsteilnehmer 11,4 mg Morphin absolut auf, davon stellten Proband J und O kein Unwohlsein fest, von den restlichen 6 Probanden beschrieben 5 (Proband F, H, M, S und R) Übelkeit ohne Erbrechen, wobei Proband F noch über Mundtrockenheit (Xerostomie) klagte. Weiterhin bemerkte Proband K Müdigkeit, Kopfschmerzen sowie Schwindel bei den Blutentnahmen. Die meisten der oben beschriebenen Symptome wie Völlegefühl, Übelkeit und Müdigkeit konnten nicht als spezifische Morphinwirkungen gedeutet werden, da sie auch allein durch den Verzehr großer Mengen fetthaltiger Lebensmittel verursacht worden sein könnten.

Jedoch schien zumindest die Mundtrockenheit von Proband F direkt mit der Morphinaufnahme in Verbindung zu stehen.

Im nächst höheren Konzentrationsbereich bemerkten die drei Probanden D, B und G, deren Morphinaufnahmen absolut in mg (relativ in µg/kg KG) 13,0 (178,5), 14,5 (195,7), 14,3 (190,5) betrugen, keine Wirkung an sich. Mit einer absoluten Morphinaufnahme von 14,5 mg (entsprechend 258,6 µg/kg KG) spürte Proband C

leichte Benommenheit, zunehmende Übelkeit und 8 h nach dem Verzehr Erbrechen und Schluckauf.

Während Proband E, mit einer relativen Morphinaufnahme von 274,2 µg/kg KG keine Wirkungen empfand, bemerkte Proband I mit einer vergleichbaren relativen Mohnaufnahme von 263,8 µg/kg 7 h nach Aufnahme Kopfschmerzen im Stirnbereich, leichte Übelkeit, Müdigkeit, Kreislaufschwäche, und ein dritter Proband P mit einer ähnlich hohen Aufnahme von 281,1 µg/kg KG klagte über Bauchschmerzen und Übelkeit.

Bei den höchsten Morphinaufnahmemengen im Bereich von absolut 20,0 - 22,9 mg zeigten alle drei Probanden morphinbedingte Effekte: Proband L (266,7 µg Morphin/kg KG) beschrieb leichte Übelkeit, Benommenheit sowie anhaltende Mundtrockenheit bis 10 h nach Aufnahme. Proband N (317,5 µg Morphin/kg KG) berichtete über steigende Müdigkeit bis 9 h nach Aufnahme, leichte Blickfeldeinschränkung und eine schwere Zunge. Bei Proband Q wurde bei einer relativen Aufnahmemenge von 228,6 µg Morphin/kg KG eine Stunde nach Verzehrende der höchste freie Morphinwert im Blut mit 17,3 ng/mL gemessen. Er hatte unmittelbar nach der Aufnahme enge Pupillen und starkes Schwitzen gezeigt sowie neben Müdigkeit und Antriebslosigkeit eine sich nach 6 Stunden entwickelnde starke Übelkeit.

Konzentrationen an freiem Morphin im Serum über 10 ng/mL, bei denen im Allgemeinen mit einer dämpfenden Wirkung auf den Organismus gerechnet wird [5], resultierten nur bei Probanden, die mehr als 14 mg Morphin aufgenommen hatten. Auch nach Aufnahmen von mehr als 14 mg Morphin konnten Serumkonzentrationen an freiem Morphin deutlich unter 10 ng/mL resultieren.

Nur bei 2 der 7 Probanden, die keine Wirkung festgestellt hatten, wurden vorübergehend Serumwerte von freiem Morphin über 10 ng/mL gemessen (B, G).

Der Versuch zeigt die große Schwankungsbreite der individuellen Reaktionen auf Morphinaufnahmen, trotz derer aber eine dosisabhängige Zunahme des Schweregrades der Effekte zu erkennen ist (z. B. von Müdigkeit bis hin zur Benommenheit, von Übelkeit bis hin zum Erbrechen). Auch nimmt der Anteil der mit unerwünschten Wirkungen reagierenden Probanden bei den höheren Aufnahmemengen zu [1].

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Wissensstandes vor Beginn des kontrollierten Essversuchs

Während es zahlreiche Studien über opiatpositive Urinproben nach Mohnverzehr gibt, wurden Untersuchungen an Blut bisher noch nicht systematisch bei einer größeren Anzahl von Probanden durchgeführt.

Hayes et al. [27] ließen 1987 in einer Teilstudie 4 Personen jeweils 7,5 mg Morphin über Mohnsamen zu sich nehmen. Sie fanden Morphin im Blut nach Hydrolyse, das bis 24 h nach Ende der Mohnaufnahme in Konzentrationen von 3-10 ng/mL nachweisbar war. Die Maximalwerte lagen nach zwei Stunden bei 82 - 131 ng/mL Gesamtmorphin im Serum.

In einer anderen Teilstudie von Hayes et al., in der 2 Personen je 2,5 mg Morphin über Mohnsamen aufnahmen, konnte auch freies Morphin in einer Maximalkonzentration von 2,5 bzw. 3,0 ng/mL 3 h nach Versuchsbeginn im Blut nachgewiesen werden. Die Maximalwerte für Gesamtmorphin betrugen nach 1,5 h 43 und 51 ng/mL.

Hauck [40] untersuchte 1990 im Rahmen einer Dissertation an der LMU München die Serumproben von zwei Probanden, die sehr geringe Mengen von Morphin in Form von Mohnkuchen zu sich genommen hatten. Nach der Aufnahme von 0,3 mg Morphin wurden 1, 2, 3 und 6 h nach Verzehrende Blutproben von jedem Teilnehmer entnommen. Die Serumproben wurden nicht hydrolysiert, es wurde also nach freiem Morphin gesucht.

Der erste Proband wies nach 1 h 8 ng/mL auf, sein höchster Wert wurde mit 10 ng/mL nach 2 h gemessen. Bei dem zweiten Probanden lag der höchste gemessene Wert nach 1 h bei 40 ng/mL. Nicht für alle Blutproben sind in der Arbeit Ergebnisse angegeben, was an der eingesetzten Methodik liegen könnte. So räumte der Autor Schwierigkeiten mit dem Nachweis derart niedriger Morphinkonzentrationen im Serum ein und die Methode (HPLC mit UV-Detektion) war nicht validiert. Da 0,3 mg Morphin selbst nach i.v.-Gabe bei Erwachsenen nicht zu derart hohen Serumkonzentrationen führen können, muss bezweifelt werden,

dass die Methodik für diese Aufgabenstellung geeignet war und die gemessenen Werte tatsächlich vorlagen.

In 2004 berichteten Moeller et. al. [25] über 5 Probanden, die im Rahmen eines Fernsehauftritts verschiedene Arten von Mohnbackwaren zu sich nahmen. Die aufgenommene Menge wurde nicht festgehalten, jedoch hatte der verwendete Mohn eine Morphinkontamination von 50 µg/kg. Die einmalig abgenommenen Serumproben waren mittels GC/MS-Analyse alle negativ auf freies Morphin, jedoch zeigten zwei Proben nach Hydrolyse Werte von bis zu 24 ng/mL Gesamtmorphin.

2004 untersuchten Rochholz et al. [46] Serumproben, die 4, 20 bzw. 26 h nach Mohnsamenverzehr bei 3 Probanden abgenommen wurden. Die Menge der aufgenommenen Mohnsamen und damit des Morphins wurde nicht festgehalten. Alle Serumproben waren mittels GC/MS-Analyse negativ auf freies Morphin, nach Hydrolyse ergaben sich Werte von maximal 36 ng/mL nach 4 h, 15,1 ng/mL nach 20 h und 9,6 ng/mL nach 26 h.

Ebenfalls im Jahre 2004 führten Andresen und Schmoldt [23] 12 Probanden 9-55 g Mohnsamen mit 1,9-11,4 mg Morphin absolut zu. Bei zwei Probanden wurden Blutproben asserviert und nach 4 bzw. 4,5 h wurden 266 bzw. 360 ng/mL Gesamtmorphin und 8,5 bzw. 13,5 ng/mL freies Morphin nachgewiesen.

Andere Studien zeigten bisher keine positiven Befunde für freies Morphin im Blut nach Mohnsamenkonsum.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse von Andresen und Schmoldt, dass freie Morphinkonzentrationen von über 10 ng/mL durch Mohnsamenkonsum zu erreichen sind. Derartig hohe Werte waren bereits 1 h nach Ende eines Mohnsamenkonsums bei 6 von 20 Probanden vorzufinden. Bei 4 Probanden wurde auch 2 h und bei 3 Probanden auch 4 h nach Verzehr eine Konzentration von freiem Morphin im Serum über 10 ng/mL nachgewiesen.

Dies zeigt, dass nach Verzehr von stark mit Morphin kontaminierten Mohnsamen über einen Zeitraum von mindestens 4 h in Blutproben freies Morphin gemessen werden kann. Die Werte können bei Verzehr größerer Mohnsamenmengen über dem

von der Grenzwertkommission vorgeschlagenen Cut-Off-Wert liegen und könnten damit nach § 24 a StVG geahndet werden. Demnach dürfen Einlassungen eines vorangegangenen Mohnsamenverzehr bei derartigen Morphinkonzentrationen nicht als Schutzbehauptung abgetan werden und müssen im Einzelfall hinterfragt und begutachtet werden.

Bei der vorliegenden Studie war Morphin nach Hydrolyse des Serums in allen untersuchten Blutproben sogar noch 24 h nach Verzehr nachweisbar. Das Maximum für Gesamtmorphin trat zeitlich interindividuell sehr unterschiedlich 1 - 8 h nach Verzehr ein. Die höchste Konzentration wies Proband B mit 353 ng/mL Gesamtmorphin nach 4 h auf. Nach 24 h betrug die maximal gemessene Konzentration noch 76,7 ng/mL (Proband K).

Übernahme der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in eine Empfehlung des Bundesinstituts für Risikobewertung

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) nahm im Jahr 2005 eine gesundheitliche Bewertung im Zusammenhang mit der akzidentellen Aufnahme von Morphin durch Mohnsamenverzehr vor. Unter Berücksichtigung bisheriger Studien und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde eine Empfehlung für eine maximale tägliche Aufnahmemenge ausgesprochen, die sich auf 6,3 µg Morphin pro kg Körpergewicht beläuft. Das entspricht bei einem 60 kg schweren Erwachsenen einer Menge von 0,38 mg Morphin, die während einer oder mehrerer Mahlzeiten über den Tag verteilt nicht überschritten werden sollte. Im Hinblick auf die durchschnittliche Verzehrmenge an Mohn und die oben genannten Werte wurde ein entsprechender vorläufiger Richtwert für den Morphingehalt von Mohnsamen von 4 mg/kg Morphin abgeleitet [1].

4.2 Neue Erkenntnisse nach Abschluss des kontrollierten Essversuchs

Sproll et al. veröffentlichten 2006/2007 mehrere Studien [50, 51, 52], die zur besseren Interpretation der Ergebnisse bisheriger Untersuchungen beitragen und die Empfehlungen des BfR in gewissen Punkten in Frage stellen.

Nach Sproll et al. wurde in den meisten bisherigen Studien eine signifikante Abnahme der Morphinkontamination durch die küchentechnische Zubereitung mohnhaltiger Lebensmittel nicht in Betracht gezogen, sodass die orale Morphinaufnahme in den meisten Fällen überschätzt wurde. Die am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe tätigen Autoren sichteten die Literatur in Hinblick auf mögliche Veränderungen des Morphingehalts von Mohnsamen durch die Nahrungsmittelherstellung. So diskutierten Meadway et al. 1998 unter anderem differierende Morphingehalte in gesiebten, gekochten und unbehandelten Mohnsamen [38], zogen dieses Wissen jedoch nicht in die Probandenversuche ein.

Weiterhin wurde in mehreren Veröffentlichungen erwähnt, dass Waschen von Mohn zu einer Abnahme des Morphingehalts führt [23, 33, 35, 38, 45].

Sproll et al. untersuchten mit statistisch gut durchgeplanten Versuchen den Morphinabbau beim Mahlen, Erhitzen und Waschen von Mohnsamen mit folgenden Ergebnissen:

Tabelle 11: Abnahme des Morphingehalts nach Mohnbehandlung [51]

Prozess	Morphinabnahme	Literatur
Abwaschen des Mohns mit heißem Wasser (2 min)	73 +/- 13 %	[52]
Mahlen des Mohns mit Labormühle	34 +/- 5 %	[50]
Mahlen des Mohns mit Mohnmühle	25 +/-15 %	[52]
Mohnkuchenherstellung (180 °C, 20 min) (mahlen und backen)	50-84 %	[50]
Mohnbrötchenherstellung (220°C)	80-90 %	[50]
Kommerzielle Herstellung von Mohnbackmischungen	100 %	[33]

Sproll et al. erklärten den Abbau des Morphins beim Mahlen von bis zu 34% durch oxidative Effekte und die Freisetzung Sauerstoff tragender Verbindungen aus den Samen [51].

Der Verlust von bis zu 90 % bei der Mohnbrötchenherstellung (Backtemperatur 220°C) wird nach Sproll et al. [51] durch temperaturkatalysierte Oxidation des Morphins verursacht, wohingegen der Mohn in einem Mohnkuchen zum einen nicht so hohen Temperaturen ausgesetzt ist (180°C) und zum anderen auch im Inneren des Kuchens vor Oxidation besser geschützt ist. Dies erklärt den geringeren Verlust von insgesamt 50-84 % bei der Mohnkuchenherstellung.

Nach Sproll et al. wurde der Richtwert des BfR für die Morphinkontamination von Mohnsamen angegeben, ohne die Abnahme des Morphingehalts der Mohnsamen bei der Herstellung von mohnhaltigen Nahrungsmitteln zu berücksichtigen. Weiterhin sei der Höchstwert von 4 mg Morphin/ kg Mohn unrealistisch niedrig, da nur ein geringer Anteil der untersuchten Mohnsamenchargen diesen strengen Richtwert hätte halten können (im Jahr 2005 nur 15,7 %). Selbst die einzige in Deutschland für den Anbau zugelassene Mohnart Przemko hätte das Potenzial, diese Höchstgrenze zu überschreiten [50]. In Anbetracht des signifikanten Morphinabbaus bei der Brötchenherstellung und der nur sehr geringen Menge an Mohnsamen auf Mohnbrötchen (durchschnittlich 1 - 4 g) gehe - moderate Morphinmengen bis zu 100 mg/kg Mohn vorausgesetzt - kein Risiko von Mohnbrötchen aus. Jedoch könne man relevante Morphinmengen durch Verzehr von Mohnfüllungen in Kuchen oder Teilchen zu sich nehmen. Sproll et al. [51] schlagen eine sichere Höchstgrenze von 20 mg/kg für Morphingehalte in Mohnsamen, die zum Backen dieser Lebensmittel verwendet werden, vor. Es werden dabei der Abbau des Morphins beim Backen sowie die durchschnittlich aufgenommene Mohnsamenmenge bei Verzehr von 2-4 Stücken Mohnkuchen einbezogen. Weiterhin wird der Richtwert des BfR für die Morphinkontamination von Mohnsamen von 4 mg/kg für unbehandelt verspeiste Mohnsamen als adäquat angesehen.

Unter Einbeziehung dieser Erkenntnisse kann man die aus dem Essversuch erhaltenen Ergebnisse differenzierter betrachten.

4.3 Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse

Erstaunlich an den Versuchsergebnissen war, dass die Konzentration von freiem Morphin im Serum nicht streng proportional zu der aufgenommenen Menge an Mohnsamen und damit an Morphin war, selbst dann nicht, wenn die Aufnahme auf das Körpergewicht bezogen wurde (vgl. z. B. Diagramme 3 und 4).

Korrektur nach Sproll et al.

Bringt man die Erkenntnisse von Sproll et al. in die Ergebnisauswertung mit ein, so führt das zu einer Differenzierung zwischen „Kuchenessern“ und „Milchreisessern“. Dafür mussten die Morphinaufnahmen der Probanden gemäß Sproll et al. korrigiert werden.

Retrospektiv konnte nicht mit Sicherheit festgelegt werden, welche Form von Mohnsamen die Probanden A-E zu sich genommen hatten, so dass diese 5 Probanden in die folgende Diskussion nicht miteinbezogen wurden.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Sproll et al. (Tabelle 11 in Kapitel 4.2) kann man davon ausgehen, dass bei der hier eingesetzten Untersuchungsmethode zur Bestimmung des Morphingehalts der Mohnsamen ca. 25 % des Morphingehalts durch das Mahlen mit einem Mörser (vergleichbar mit einer Mohnmühle aus Tabelle 11) verloren gingen. Damit dürfte der Ausgangsmorphingehalt des australischen Mohns, der bei den Probanden F-T verwendet wurde, nicht bei 114,3 mg/kg sondern bei 152,4 mg/kg gelegen haben.

Die für den Essversuch benötigten größeren Mengen Mohnsamen wurden in einem „Körnermarkt“ in Kiel mit einer groben Mohnmühle gemahlen, was zu einem ungefähr gleichen Verlust wie das grobe Mahlen mit einem Mörser geführt haben dürfte. Da dieser Mohn direkt in den kalten Milchreis eingerührt wurde, mussten keine weiteren Korrekturen für die Mohnaufnahme der „Milchreisgruppe“ gemacht werden; der Morphingehalt der gemahlenen Mohnsamen im Milchreis dürfte bei ca. 114,3 mg/kg gelegen haben.

Bei den „Kuchenessern“ allerdings mussten aufgrund von Morphinverlusten während des Backvorgangs ca. 50-84 % (gemittelt 67%) von dem errechneten Ausgangsmorphingehalt des Mohns abgezogen werden, was zu einem errechneten Morphingehalt der Mohnsamen im Kuchen von 50,3 mg/kg führte.

In nachstehender Tabelle sind die absoluten und relativen Morphinaufnahmen mit diesen Werten korrigiert und zusammen mit den „4 h-Mittelwerten“ des freien Morphins und den „8 h-Mittelwerten“ des Gesamtmorphins wiedergegeben.

Tabelle 12: Nach den Versuchsergebnissen von Sproll et al. korrigierte Morphinaufnahmemengen und korrespondierende „4 h-Mittelwerte“ des freien Morphins und „8 h-Mittelwerte“ des Gesamtmorphins

Proband	Kuchen (K) oder Milchreis (M)	Korrigierte absolute Morphin- aufnahme (mg)	Korrigierte relative Morphin- aufnahme (µg/kg)	„4 h-Mittelwert“ des freien Morphins (ng/mL)	„8 h-Mittelwert“ des Gesamt- morphins (ng/mL)
F	K	5,0	59,2	4,5	57,9
G	M	14,3	190,5	9,7	163,6
H	K	5,0	83,8	5,4	62,5
I	M	17,1	263,8	10,8	72,3
J	K	5,0	71,9	7,6	59,7
K	K	5,0	62,9	3,4	83,2
L	K	8,8	117,3	4,1	52,9
M	K	5,0	67,1	4,5	93,0
N	M	22,9	317,5	12,3	212,5
O	K	5,0	82,5	6,1	27,4
P	M	17,1	281,1	12,3	73,7
Q	M	22,9	228,6	14,1	201,5
R	K	5,0	67,1	5,8	60,9
S	K	5,0	75,1	6,5	48,2
T	K/M	2,1	29,6	1,2	23,1

Proband T hatte seine Mohnsamen je zur Hälfte in Form von Milchreis und Kuchen aufgenommen.

Die freien und Gesamtmorphinkonzentrationen wurden in den nachstehenden Diagrammen auf diese korrigierten Daten bezogen.

Abhängigkeit der Serumkonzentrationen des freien Morphins von der nach Sproll et al. korrigierten relativen Morphinaufnahme

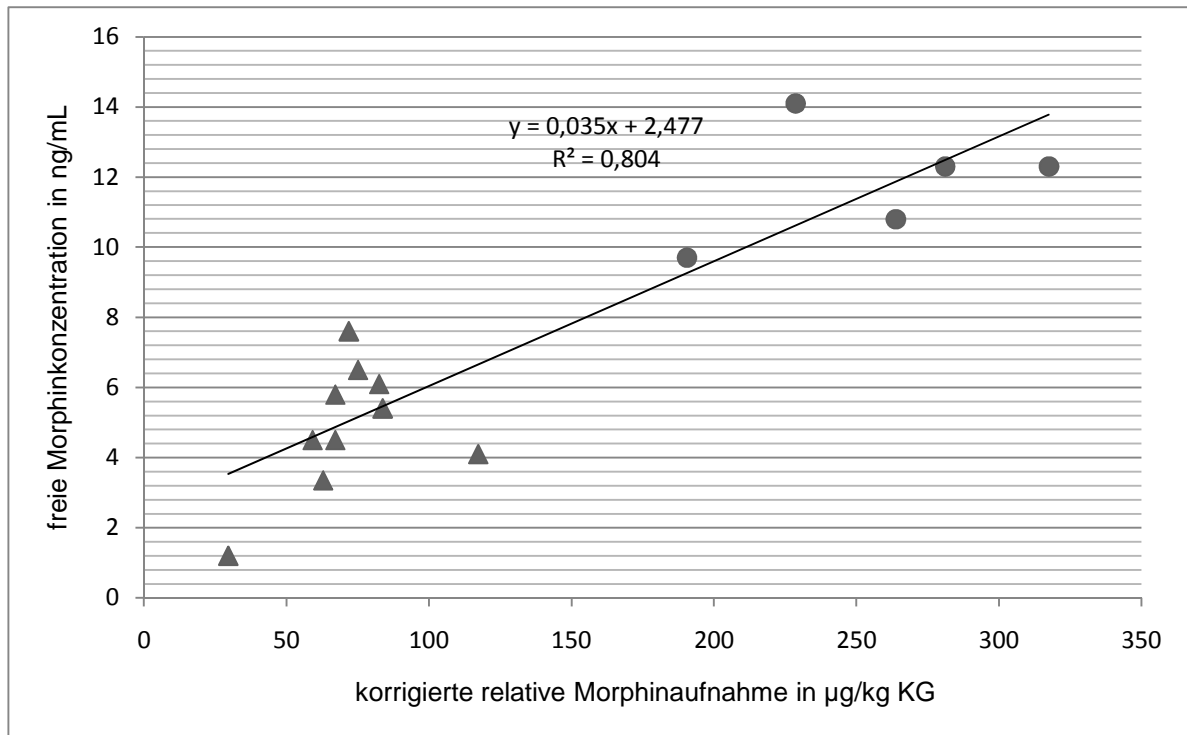


Diagramm 7: „4 h-Mittelwerte“ der freien Morphinkonzentrationen (in ng/mL) gegen die korrigierte relative Morphinaufnahme (in µg/kg KG), ▲ „Kuchenesser“, ● „Milchreisesser“

Es zeigte sich, dass sich das Probandenkollektiv in zwei Gruppen, nämlich die „Kuchenesser“ und die „Milchreisesser“ unterteilte. Nun war eine deutliche Proportionalität ($R^2=0,804$) zwischen der freien Morphinkonzentration im Serum und der korrigierten relativen Morphinaufnahme zu erkennen.

Somit lässt sich nun unter Berücksichtigung der Morphinkonzentration und der küchentechnischen Verarbeitung der Mohnsamen aus der Menge des verzehrten Mohns und dem Körpergewicht auf die ungefähre mittlere Serumkonzentration von freiem Morphin in den ersten 4 h nach Mohnsamenverzehr schließen. Ebenso kann man von gemessenen Serumkonzentrationen wiederum Schlüsse auf die relative Morphinaufnahme ziehen.

Abhängigkeit der Serumkonzentrationen des Gesamtmorphins von der nach Sproll et al. korrigierten relativen Morphinaufnahme

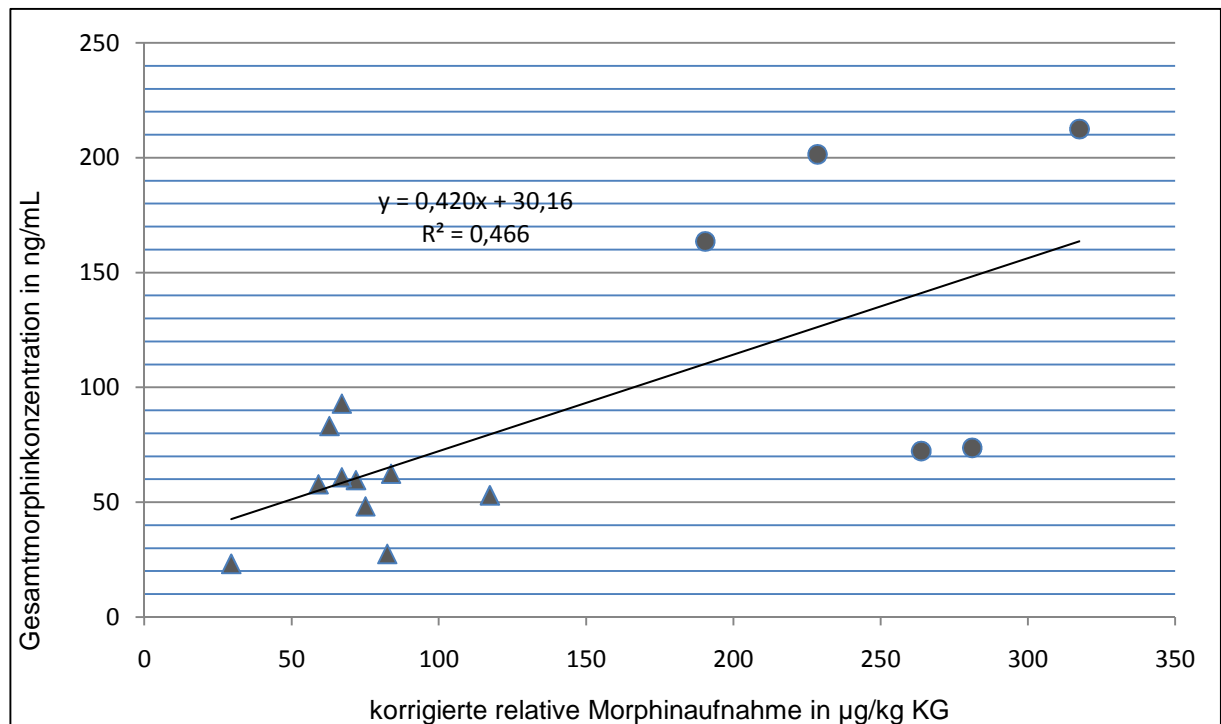


Diagramm 8: Abhängigkeit der „8 h-Mittelwerte“ der Gesamtmorphinkonzentrationen (in ng/mL) von der korrigierten relativen Morphinaufnahme (in µg/kg KG),

▲ „Kuchenesser“, ● „Milchreisesser“

Die Linearität zwischen den „8 h-Mittelwerten“ der Gesamtmorphinkonzentration und der relativen Morphinaufnahme war deutlich besser mit den korrigierten Aufnahmewerten als mit den Ursprungswerten (Diagramm 4). Sie war jedoch mit $R^2=0,466$ insgesamt schwächer ausgeprägt als bei den „4 h-Mittelwerten“ des freien Morphins mit $R^2=0,804$ (Diagramm 7). Dies könnte mit den großen interindividuellen Unterschieden, wann die Gesamtmorphinwerte ihr Maximum aufwiesen und damit mit dem größeren Zeitfenster, über das gemittelt wurde, zusammenhängen.

Die Ergebnisse nach Korrektur der Morphinaufnahmen unterstützen die These von Sproll et al., dass entsprechende Verarbeitungen von Mohnsamen, wie Mahlen oder Backen zu unterschiedlich starken Abnahmen des Morphingehalts in Mohnsamen führt.

Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Konzentration von freiem Morphin im Serum nach Gruppierung der Probanden in „Kuchenesser“ und „Milchreisesser“

Diagramm 9 zeigt den zeitlichen Verlauf der Konzentration von freiem Morphin im Serum bei den Probanden F-S ohne zu unterscheiden, ob die Mohnsamen durch Kuchen- oder Milchreisverzehr aufgenommen wurden.

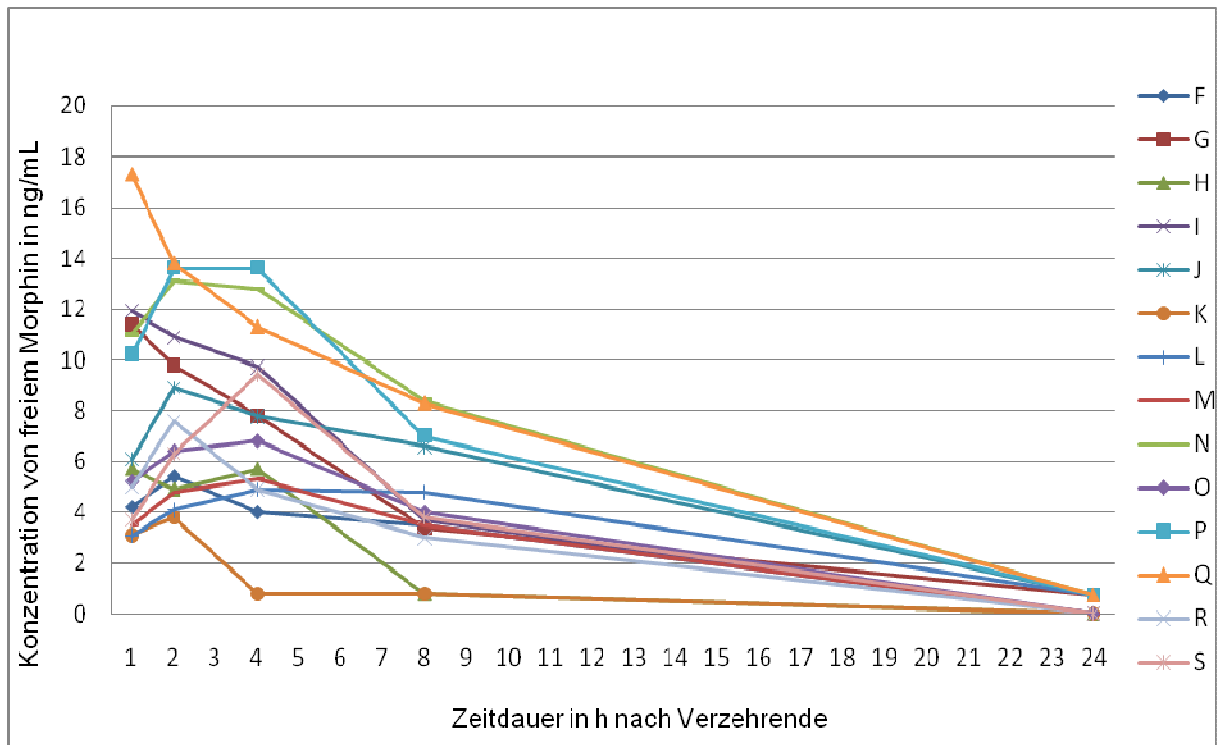


Diagramm 9: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von freiem Morphin über 24 h bei den Probanden F-S

Durch die Korrektur der Morphinaufnahmen teilt sich das Probandenkollektiv F - S in 9 „Kuchenesser“ (Probanden F, H, J, K, R, L, O, M, S) und 5 „Milchreisesser“ (Probanden G, I, N, P, Q) auf.

Im folgenden Abschnitt wurde der zeitliche Verlauf der Serumkonzentrationen von freiem Morphin zuerst bei den „Kuchenessern“, dann bei den „Milchreisessern“ getrennt betrachtet. Proband T wurde in diesem Abschnitt nicht berücksichtigt, da er sowohl Kuchen als auch Milchreis gegessen hatte, und somit keiner bestimmten Gruppe zuzuordnen war.

Bei 6 Probanden (G, J, L, N, P, Q) lagen die freien Morphinkonzentrationen nach 24 h zwischen der Nachweisgrenze von 0,74 ng/mL und der Bestimmungsgrenze

von 2,82 ng/mL. Bei diesen Proben wurde die Nachweisgrenze als Messwert eingezeichnet, weil aus statistischen Gründen kein genauer Zahlenwert angegeben werden darf.

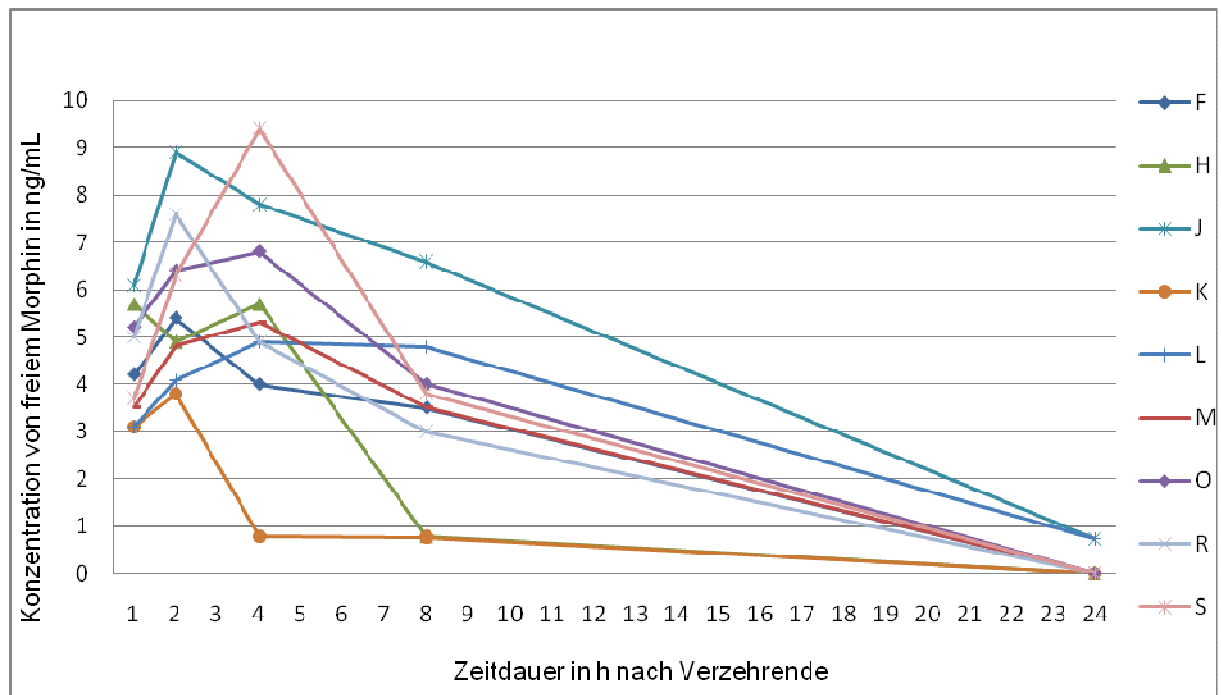


Diagramm 10: Zeitlicher Verlauf der freien Morphinkonzentrationen im Serum bei den „Kuchenessern“

Bei den „Kuchenessern“ fällt auf, dass die Spitzenkonzentrationen bei 4 Probanden (F, J, K, R) nach 2 h und bei den weiteren 5 Probanden (H, L, M, O, S) nach 4 h erreicht werden. In der ersten Gruppe hatten 3 von 4 Probanden vor Mohnverzehr gefastet (F, J, R), in der zweiten Gruppe hatten 4 von 5 Probanden (H, L, O, S) eine Mahlzeit vor dem kontrollierten Mohnverzehr aufgenommen.

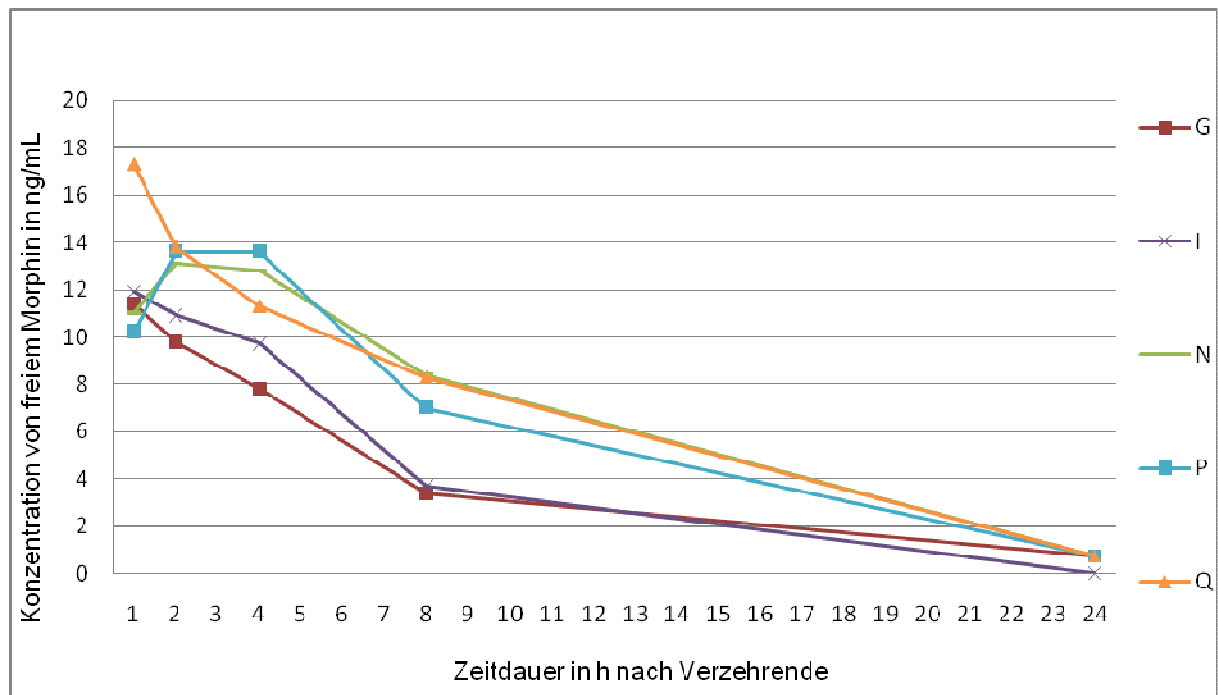


Diagramm 11: Zeitlicher Verlauf der freien Morphinkonzentrationen im Serum bei den „Milchreisessern“

Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Serumkonzentrationen an freiem Morphin bei den 5 „Milchreisessern“ wird ersichtlich, dass die Spitzenkonzentrationen bei 3 Probanden (G, I, Q) in der ersten Serumprobe (1 h), und bei 2 Probanden (N, P) in der zweiten Serumprobe (2 h) gemessen wurden. In der ersten Gruppe hatten 2 von 3 Probanden gefastet, in der zweiten Gruppe bestand eine gleichmäßige Verteilung dieser Variable (einmal Karenz, einmal Mahlzeit vor Mohnaufnahme).

Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der freien Morphinkonzentrationen zeigt sich, dass bei den „Kuchenessern“ die maximalen Serumkonzentrationen tendenziell später als bei den „Milchreisessern“ erhalten wurden. Bei den „Milchreisessern“ traten Serumspitzenwerte von freiem Morphin möglicherweise schon vor der ersten Blutentnahme auf. In drei Fällen wurde kein „peak“ gemessen, sondern es fanden sich nur noch stetig fallende Konzentrationen (Proband G, I und Q). Diese Beobachtung würde einer Angabe aus der Literatur entsprechen, dass sich bei oraler Morphinaufnahme Serumspitzenwerte schon nach 30 Minuten finden lassen [4].

Mehrere Faktoren könnten für die Unterschiede des zeitlichen Verlaufs der Morphinkonzentrationen im Serum bei den „Kuchenessern“ und „Milchreisessern“ verantwortlich sein: Entsprechend oraler medizinischer Morphinapplikation sind neben der pharmazeutischen Verarbeitung des Präparates (z.B. Kapseln, Tabletten, Lösung) auch beim Patienten liegende Faktoren für die Zeitdauer der Absorption und Metabolisierung von Relevanz.

Morphin liegt als schwache Base mit einem pKa-Wert von 8 im sauren Milieu des Magens zum größten Teil ionisiert vor, und das Morphinmolekül kann im geladenen Zustand die Magenwand nur schwer überwinden. Es wird hauptsächlich erst nach Magenentleerung im alkalischen Milieu des oberen Dünndarms als ungeladenes Molekül absorbiert [10].

Somit spielt die Zeitdauer der Magenentleerung eine wichtige Rolle für das zeitliche Auftreten der Serumspitzenwerte.

In diesem Zusammenhang ist im vorliegenden Versuch von Bedeutung, ob vor der Morphinaufnahme gefastet wurde. Andererseits ist die Magenverweildauer des morphintragenden Nahrungsmittels von Interesse.

Es kann angenommen werden, dass ein Stück Mohnkuchen aufgrund des Volumens, der Konsistenz und des höheren Fettanteils länger im Magen verbleibt als eine Portion Milchreis.

Diese Annahme wird durch die Beobachtung bestätigt, dass die „Kuchenesser“ Serumspitzenwerte nach durchschnittlich 3,1 h (4 Probanden nach 2 h, 5 Probanden nach 4 h), die „Milchreisesser“ hingegen nach 1,4 h (3 Probanden nach 1 h, 2 Probanden nach 2 h) erreichten.

Aufgrund des kleinen Probandenkollektivs ist eine klare Aussage über die Ursache der unterschiedlichen zeitlichen Konzentrationsverläufe nicht möglich.

Einfluss der Nahrungskarenz

Es scheint ein Trend zu bestehen, dass ein zuvor gefüllter Magen bei Mohnaufnahme die Absorption von Morphin aus dem Darm verzögert, und ein leerer Magen zu schnellerem Anfluten von Morphin im Serum führt. So hatten bei den „Kuchenessern“ bzw. bei den „Milchreisessern“ 75 % bzw. 66 % der Probanden mit frühen Spitzenkonzentrationen von Morphin vor dem Mohnkonsum gefastet. Dagegen hatten 80 % bzw. 50 % der Probanden mit späteren Spitzenkonzentrationen eine Mahlzeit vor dem Mohnverzehr zu sich genommen.

Damit konnte die Beobachtung von Beer et al. [49] in unserem Versuch nicht bestätigt werden, dass die Resorption von Morphin durch eine bestehende Magenfüllung begünstigt wird.

Kernaussage

Die Kernaussage dieser Arbeit wird von den Erkenntnissen von Sproll et al. nicht beeinflusst.

Es wurden bei 6 von 20 Versuchsteilnehmern nach Verzehr von Mohnprodukten freie Morphinkonzentrationen oberhalb des für den § 24a StVG relevanten Cut-Off-Wertes von 10 ng/mL gefunden. Der durchschnittliche Mohnkuchen einer Großbäckerei hat um die 30 % Mohnanteil, wobei ein Stück Kuchen zwischen 150 und 200 g wiegt [50]. Bei Verzehr von zwei bis vier Stücken kann man zwischen 90 und 240 g Mohn verspeisen.

Der Verzehr von realistischen Mengen im Bereich von 90 bis 240 g Mohn resultierte bei 6 von 20 Teilnehmern in Serumkonzentrationen von freiem Morphin, die zu einer Ahndung nach § 24a StVG führen könnten. Im Moment kann in Fällen, in denen zwischen einer Heroinaufnahme und Mohnkonsum unterschieden werden muss, nur ein Nachweis von 6-Monoacetylmorphin oder Acetylcodein beweisen, dass Heroin konsumiert wurde. Falls in der Blutprobe oder einer eventuell vorliegenden Urinprobe dieser Nachweis aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeiten dieser Substanzen nicht möglich ist, kann eine Haaranalyse Aussagen darüber liefern, ob in der Vorgeschichte Heroin konsumiert wurde. Dies sagt jedoch nichts darüber aus, aus welcher Quelle das in der Blutprobe nachgewiesene Morphin stammt.

Somit kann der Nachweis von freiem Morphin im Serum nach Mohnkonsum in einer Konzentration von über 10 ng/mL auf Ebene des § 24a StVG zu rechtlichen sowie durch positive Drogentests am Arbeitsplatz oder an der Schule auch zu sozialen Konsequenzen führen.

Gesundheitliches Risiko

13 von 20 Probanden beschrieben Symptome, die von unspezifischen Erscheinungen, wie Müdigkeit und Kopfschmerzen bis zu typischen Morphinnebenwirkungen, wie Mundtrockenheit und Miktionshemmung reichten. Unter anderem wurde auch von Bauchschmerzen bis hin zu Übelkeit und Erbrechen berichtet.

Ohne Kontrollgruppe ist es nicht möglich, diese Symptomatik alleine der Morphinaufnahme zuzuordnen. Sie könnte möglicherweise auch auf übermäßiges Essen fettreicher Nahrungsmittel zurückzuführen sein.

In der Literatur werden jedoch klare Beispiele von Morphinintoxikationen infolge von Mohnkonsum beschrieben.

Ein 6 Monate alter Säugling zeigte Atemstörungen und musste intensivmedizinisch behandelt werden, nachdem ihm seine Mutter 75 mL eines aus Milch und Mohn zubereiteten Schlaftrunks verabreicht hatte. Sie hatte gemäß eines dafür vorgesehenen Rezeptes aus einem aktuellen Kochbuch 500 mL Milch über 200 g Mohn abgeseiht und Honig beigemischt. Die Mutter hatte dabei nur die Hälfte der in dem Rezept angegebenen Menge an Mohnsamen benutzt [5].

Sproll et. al berichtete von einem weiteren Beispiel dieser Problematik als im Jahre 2005 eine Frau in Baden-Württemberg Nudeln mit einer Mohn-Zucker-Mischung verzehrte und sie in den folgenden 24 h an Sedation, Übelkeit und Erbrechen litt [50]. In beiden Fällen wurden relativ kleine Mengen an unbehandeltem, stark kontaminierten Mohn verzehrt. Das größte Risiko geht demnach von Mohn aus, der unbehandelt dem fertigen Gericht beigefügt wird, was zum Beispiel bei Dampfnudeln, Germknödeln oder auch in bestimmten Joghurtsorten der Fall ist.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und der oben genannten Beispiele besteht generell ein von Mohnverzehr ausgehendes, ernst zu nehmendes Risiko, insbesondere bei Neugeborenen sowie bei Schwangeren und Patienten mit Leber- oder Niereninsuffizienz.

Weiterhin ist, wie oben erörtert, eine Ahndung nach § 24a StVG nach Genuss stark kontaminierter Mohnsamen möglich.

Daher muss dringend empfohlen werden, importierte Mohnchargen routinemäßig vor Verteilung an den Konsumenten auf den Morphingehalt hin zu testen sowie Mohnchargen mit einem Morphingehalt größer als 4 mg/kg zu verschneiden oder zu waschen, bevor sie in den Vertrieb an Einzelverbraucher gehen.

5. Zusammenfassung

Die Samen des Schlafmohns (*Papaver somniferum* L.) dienen in der Lebensmittelindustrie vor allem als Backzutaten. Sie selbst enthalten fast keine Opiumalkaloide, können aber mit dem Milchsaft der Pflanze kontaminiert sein. Der Milchsaft kann je nach Sorte und Anzuchtbedingungen größere Mengen an Opiumalkaloiden, wie z. B. Morphin und Codein aufweisen.

Das Phänomen, dass Mohnsamenzehr häufig zu positiven Opiat-Befunden im Urin führt, war generell bekannt, ob sich jedoch auch nach Mohnkonsum freies Morphin im Blut nachweisen lässt, war systematisch noch nicht untersucht worden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob es nach Mohnsamenzehr zu eindeutig nachweisbaren Opiatbefunden in Serumproben kommen kann, und welche Höhe die Serumkonzentrationen von Morphin erreichen können.

Es sollte die Basis für eine Abschätzung des gesundheitlichen Risikos durch Verzehr morphinhaltiger Mohnsamenzehr gelegt werden. Hauptsächlich sollte dieser Fragestellung jedoch unter verkehrsmedizinischen Aspekten nachgegangen werden, insbesondere im Hinblick auf § 24a des Straßenverkehrsgesetzes (StVG). Danach handelt ordnungswidrig, wer unter der Wirkung von zum Beispiel Morphin oder Heroin im Straßenverkehr ein Kraftfahrzeug führt. Von einer Wirkung wird ausgegangen, wenn Morphin im Blut nachgewiesen wird. Von der das Bundesministerium für Verkehr, Bau- und Wohnungswesen beratenden „Grenzwertkommission“ wird zurzeit als Cut-Off-Wert für freies Morphin eine Konzentration von 10 ng/mL empfohlen, unterhalb der keine Bestrafung erfolgen sollte.

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde in der Rechtsmedizin Kiel eine Methode entwickelt, um kleinste Konzentrationen an Morphin und Codein in Serumproben nach automatisierter Festphasenextraktion mittels GC/MS nachweisen und quantifizieren zu können. Weiterhin wurde diese quantitative GC/MS-Methode nach den Richtlinien der für die forensische Toxikologie maßgeblichen Fachgesellschaft (GTFCh) validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die verwendete GC/MS-Methode sehr verlässliche und gut reproduzierbare Ergebnisse bei niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liefert, die die Forderungen der GTFCh an eine

routinemäßig eingesetzte quantitative Untersuchungsmethode erfüllt.

Um oben genannte Fragestellung bearbeiten zu können, wurde ein umfangreiches Experiment durchgeführt, bei dem 20 Probanden (8 weiblich, 12 männlich) im Alter von 19 bis 45 Jahren innerhalb von 90 min 25 g bis 250 g Mohnsamen in Form eines Mohnbreis mit Milchreis und/oder eines Mohnkuchens verzehrten. Es wurden zwei Mohnsamenchargen verwendet, in denen Morphingehalte von 72,4 mg/kg bzw. 114,3 mg/kg nach Mahlen nachgewiesen wurden. 1, 2, 4, 8 und 24 h nach Verzehr erfolgte Blutentnahmen und eine Bestimmung sowohl von freiem als auch von freiem und konjugiertem Morphin und Codein.

1 h nach Ende des Mohnsamenkonsums wurde bei 6 von 20 Probanden freies Morphin im Serum in Konzentrationen von mehr als 10 ng/mL festgestellt. Bei 4 Probanden wurde auch 2 h und bei 3 Probanden auch 4 h nach Verzehr eine Konzentration von freiem Morphin im Serum über 10 ng/mL nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Verzehr realistischer Mengen an Mohnsamen aus Chargen, die erheblich mit Morphin kontaminiert sind, Morphinaufnahmen resultieren können, die im oberen Bereich der Spanne für oral verabreichte, therapeutische Einzeldosen liegen.

Aus gesundheitlicher Sicht warnt das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), dass in solchen Fällen bei Säuglingen, Kleinkindern und alten oder kranken Menschen mit ernstesten zentralnervösen und peripheren Wirkungen, die Bewusstseinsbeeinträchtigungen, Atemdepression und Herzkreislauffeffekte einbeziehen, gerechnet werden muss.

Mit Blick auf Verstöße gegen § 24a StVG kann aus den Untersuchungen gefolgert werden, dass bei einem Nachweis von freiem Morphin im Blut in Konzentrationen zwischen 10 und 20 ng/mL ein Mohnsamenverzehr als Ursache nicht ausgeschlossen werden kann, und somit eine Ahndung nach § 24a StVG möglich wäre.

Diese Erkenntnisse führten zu Forderungen von Seiten mehrerer Forschungsgruppen und Institutionen, wie z.B. des BfR, importierte Mohnchargen routinemäßig vor Verteilung an den Konsumenten auf den Morphingehalt hin zu testen, sowie Mohnchargen mit einem Morphingehalt größer als 4 mg/kg zu verschneiden oder zu waschen, bevor sie in den Vertrieb an Einzelverbraucher gehen.

6. Literatur:

- 1) BfR (2005): BfR empfiehlt eine vorläufige maximale tägliche Aufnahmemenge und einen Richtwert für Morphin in Mohnsamen. Gesundheitliche Bewertung 012/2006. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
- 2) v. Bruchhausen, F., Hager, H., Abel, G., Blaschek, W., Heubl, G., Teuscher, E. (1998): Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg
- 3) Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G., Wichtl, M. (2004): Kommentar zum Europäischen Arzneibuch. Band 7, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- 4) Aktories, B., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl., Urban&Fischer Verlag
- 5) Rochholz, G., Westphal, F., Kuhlmann, A. (2005): Erhöhte Morphingehalte in Mohnprodukten und deren Folgen. Cereal Technol, 59, 239-243
- 6) Winkler, M.S. (2005): Untersuchungen zu postmortalen Veränderungen illegaler Betäubungsmittel in Körperflüssigkeiten und Organen. Biol. Hum. Diss., Ulm
- 7) Karow, T., Lang-Roth, R. (2004): Pharmakologie und Toxikologie. 12. Aufl., Karow, Pulheim

- 8) Hardman, J.G., Goodman, L.S., Ruddon, R.W., Limbird, L.E., Gilman, A., Rall, T.W., Molinoff, P.B. (1996): The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed., McGraw-Hill Health Professions Division
- 9) BfR (2005): Backmohn ist kein Schlafmittel für Säuglinge.
BfR-Pressemitteilung Nr. 12 vom 29.04.2005
- 10) Peck, T.E., Hill, S.A., Williams, M. (2008): Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care. 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge
- 11) Baselt, R.C. (2000): Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 5th ed., Chemical Toxicology Institute, University of Michigan
- 12) Martindale, W. (2005): The complete drug reference. 34th ed., Pharmaceutical Press, London
- 13) Rote Liste (2005) Editio Cantor Verlag, Aullendorf
- 14) Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (1999): Pharmakologie und Toxikologie. 14. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart
- 15) Golianu, B., Krane, E.J., Galloway, K.S., Yaster, M. (2000):
Pediatric acute pain management. *Pediatr. Clin. North Am*, 47/3, 559-587
- 16) Llewellyn, N., Liley, A., Moriarty, A. (2000):
Management of postoperative pain in infants and children.
Curr. Anaesth. Crit. Care, 11, 255-261
- 17) Gschwinde, Th. (2007): Rauschdrogen: Marktformen und Wirkungsweisen. 5. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg

- 18) Iten, P.X. (1994): Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluss-
Forensische Interpretation und Begutachtung. 1. Aufl.
Institut für Rechtsmedizin der Universität Zürich, Zürich

- 19) Stein, C. (1999): Opioids in pain control: basic and clinical aspects.
1st ed., Cambridge University Press, Cambridge

- 20) Pinnock, C., Lin, T., Smith, T. (2002): Fundamentals of Anaesthesia.
2nd ed., Aditya Books PVT. Ltd., New Delhi

- 21) British Medical Association and Royal Pharmaceutical Society of Great
Britain (2007): British National Formulary. BMJ Publishing Group Ltd.,
London

- 22) Drasch, G., v. Meyer, L., Sachs, H., Roeder, G. (1996): Morphin-Gehalt in
Mohnsamen (Blaumohn). Vortrag auf der 75. DGRM-Jahrestagung in
Zürich

- 23) Andresen, H., Schmoldt, A. (2004): Führt der Verzehr von Mohnsamen zu
positiven Opiat-Befunden in Urin, Blut und Haaren?
Blutalkohol, 41, 191-202

- 24) Fritschi, G., Prescott, W.R. (1985): Morphine levels in urine subsequent to
poppy seed consumption. Forensic Sci. Int, 27(2), 111-117

- 25) Möller, M.R., Hammer, K., Engel, O. (2004): Poppy seed consumption
and toxicological analysis of blood and urine samples.
Forensic Sci. Int, 143, 183-186

- 26) Beck, O., Vitols, S., Stensiö, M. (1990): Positive urine screening for opiates after consumption of sandwich bread with poppy seed flavoring. *Ther. Drug Monit*, 12, 585-586
- 27) Hayes, L.W., Krasselt, W.G., Mueggler, P.A. (1987): Concentrations of morphine and codeine in serum and urine after ingestion of poppy seeds. *Clin. Chem*, 33, 806-808
- 28) Pelders, M.G., Ros, J.J. (1996): Poppy seeds: differences in morphine and codeine content and variation in inter- and intra-individual excretion. *J. Forensic Sci.*, 41, 209-212
- 29) ElSohly, H.N., ElSohly, M.A., Stanford, D.F. (1990): Poppy seed ingestion and opiates urinalysis: a closer look. *J. Anal. Toxicol*, 14, 308-310
- 30) Paul, B.D., Dreka, C., Knight, E.S., Smith, M.L. (1996): Gas chromatographic/mass spectrometric detection of narcotine, papaverine, and thebaine in seeds of *papaver somniferum*. *Planta Med*, 62, 544-547
- 31) Casella, G., Wu, A.H., Shaw, B.R., Hill, D.W. (1997): The analysis of thebaine in urine for the detection of poppy seed consumption. *J. Anal. Toxicol*, 21, 376-383
- 32) Thevis, M., Opfermann, G., Schänzer, W. (2003): Urinary concentrations of morphine and codeine after consumption of poppy seeds. *J. Anal. Toxicol*, 27, 53-56

- 33) Bjerver, K., Jonsson, J., Nilsson, A., Schuberth, J., Schuberth, J. (1982): Morphine intake from poppy seed food. J. Pharm. Pharmacol, 34, 798-801

- 34) ElSohly, H.N., Stanford, D.F., Jones, A.B., ElSohly, M.A., Snyder, H., Pedersen, C. (1988): Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of morphine and codeine in human urine of poppy seed eaters. J. Forensic Sci., 33, 347-356

- 35) Lo, D.S., Chua, T.H. (1992): Poppy seeds: implications of consumption. Med. Sci. Law, 32, 296-302

- 36) Kollias-Baker, C., Sams, R. (2002): Detection of morphine in blood and urine samples from horses administered poppy seeds and morphine sulfate orally. J. Anal. Toxicol, 26, 81-86

- 37) Clausnitzer, C., Grosse, J., Neitzel, P. (1991): Mohnkuchen als mögliche Ursache von positiven Befunden bei Dopingkontrollen. Med. Sport (Berl.), 31, 92-94

- 38) Meadway, C., George, S., Braithwaite, R. (1998): Opiate concentrations following the ingestion of poppy seed products - evidence for 'the poppy seed defence'. Forensic Sci. Int, 96, 29-38

- 39) Mulé, S.J., Casella, G.A. (1988): Rendering the "poppy-seed defense" defenseless: identification of 6-monoacetylmorphine in urine by gas chromatography/mass spectroscopy. Clin. Chem, 34, 1427-1430

- 40) Hauck, C. (1990): Zum Opiatgehalt von Körperflüssigkeiten nach dem Genuß von Mohnsamen. Med. Diss., LMU München

- 41) Pettitt, B.C., Dyszel, S.M., Hood, L.V. (1987): Opiates in poppy seed: effect on urinalysis results after consumption of poppy seed cake-filling. Clin. Chem, 33, 1251-1252

- 42) Selavka, C.M. (1991): Poppy seed ingestion as a contributing factor to opiate-positive urinalysis results: the pacific perspective. J. Forensic Sci, 36, 685-696

- 43) Kapoor, L.D. (1995): Opium poppy: botany, chemistry, and pharmacology. Haworth Press, London

- 44) Perz, R., Sproll, C., Lachenmeier, D.W., Buschmann, R. (2007): Opiate in Speisemohn - ein Problem der Globalisierung des Handels? Dtsch. Lebensmitt. Rundsch, 103, 193-196

- 45) Grove, M.D., Spencer, G.F., Wakeman, M.V., Tookey, H.L. (1976): Morphine and codeine in poppy seed. J. Agric. Food Chem, 24, 896-897

- 46) Rochholz, G., Westphal, F., Wiesbrock, U.O., Schütz, H.W. (2004): Opiat-Nachweis in Urin, Blut und Haaren nach Verzehr mohnsamenhaltiger Backwaren. Blutalkohol, 41, 319-329

- 47) Schäfer, J. (2008): Bestimmung von Amphetaminderivaten und verwandten Designer-Drogen im Serum – Screening, Identifizierung und Quantifizierung mittels Immunchemie und Gaschromatographie/Massenspektrometrie. Med. Diss., Kiel

- 48) Schmitt, G., Herbold, M., Peters, F. (2003): Methodenvvalidierung im forensich-toxikologischen Labor. ARVECON GmbH, 10-15

- 49) Beer, J.H., Vogt, A., Bernhard, W. (1994): Gourmet restaurant syndrome. Lancet, 343, 13

- 50) Sproll, C., Perz, R.C., Lachenmeier, D.W. (2006): Optimized LC/MS/MS analysis of morphine and codeine in poppy seed and evaluation of their fate during food processing as a basis for risk analysis. J. Agric. Food Chem, 54, 5292-5298

- 51) Sproll, C., Lachenmeier, D.W. (2007): Methodische Fehler bei der forensischen Interpretation der Folgen des Konsums von mohnhaltigen Lebensmitteln. Blutalkohol, 44, 360-369

- 52) Sproll, C., Perz, R.C., Buschmann, R., Lachenmeier, D.W. (2007): Guidelines for reduction of morphine in poppy seed intended for food purposes. Eur. Food Res. Technol, 226(1-2), 307-310

7. Anhang

A. GC-MS

Ofen-Temperaturprogramm

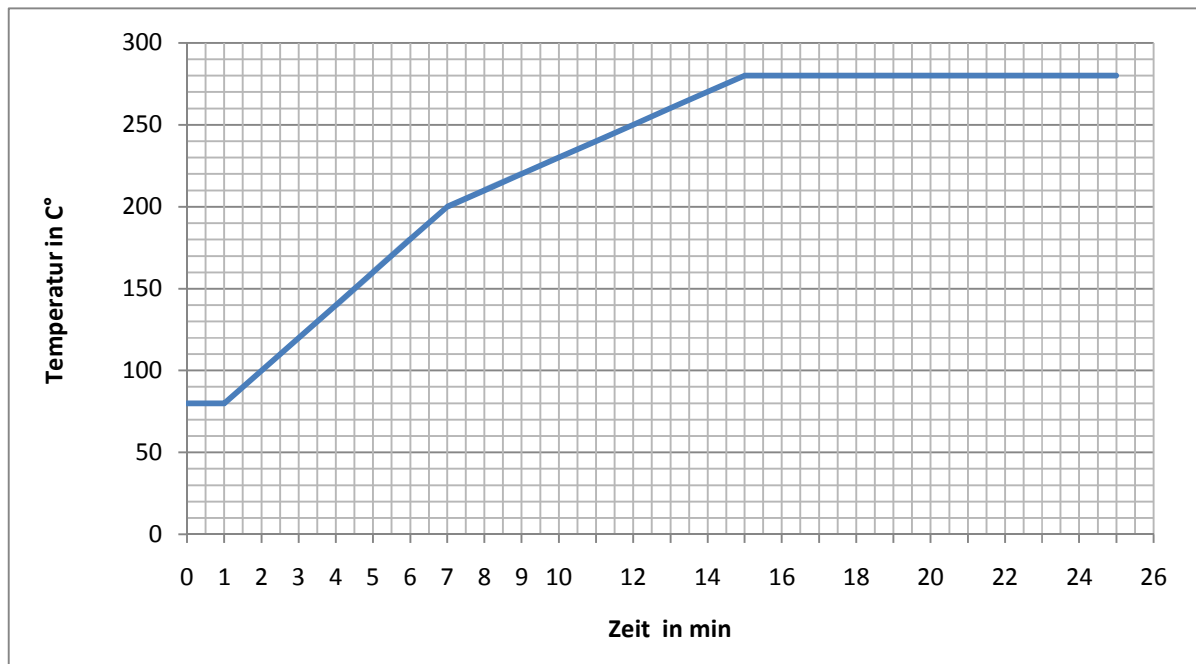


Abbildung 1: Temperatursteuering des GC-Ofens

Temperaturprogramm: 80 °C 1 min, 20 °C/min bis 200 °C, 10 °C/min bis zur Endtemperatur 280 °C, Haltezeit 10 min, Gesamtanalysendauer: 25 min;

B. Chromatogramme

Beispielchromatogramme im SIM-Modus bei der Auswertung von Morphin in Extrakten von Serumproben aus dem Essversuch.

Die Darstellung der SIM-Chromatogramme erfolgte mit der GS/MS-Software MSD Chemstation, Version D01.02.16.

Achsenbezeichnungen:

x-Achse: Zeit in Minuten; der IS von Morphin tritt ca. bei 11,41 min auf, wohingegen die Ionen des Morphin bei ca. 11,43 min folgen
y-Achse: Intensität der jeweiligen Massenfragmente (m/z)

Nachstehendes Bild zeigt ein SIM-Chromatogramm eines Serums mit einer Morphinkonzentration von 4,9 ng/ml.

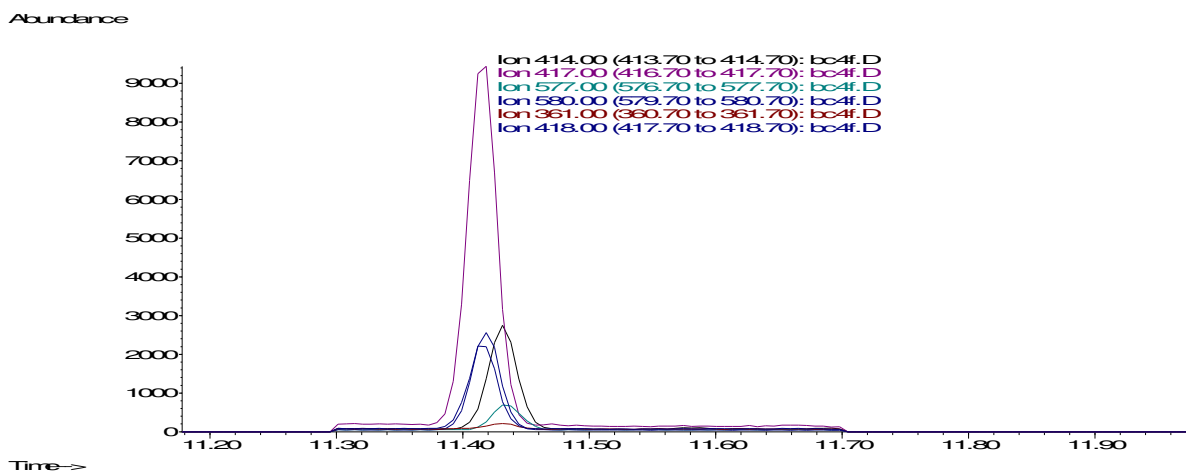
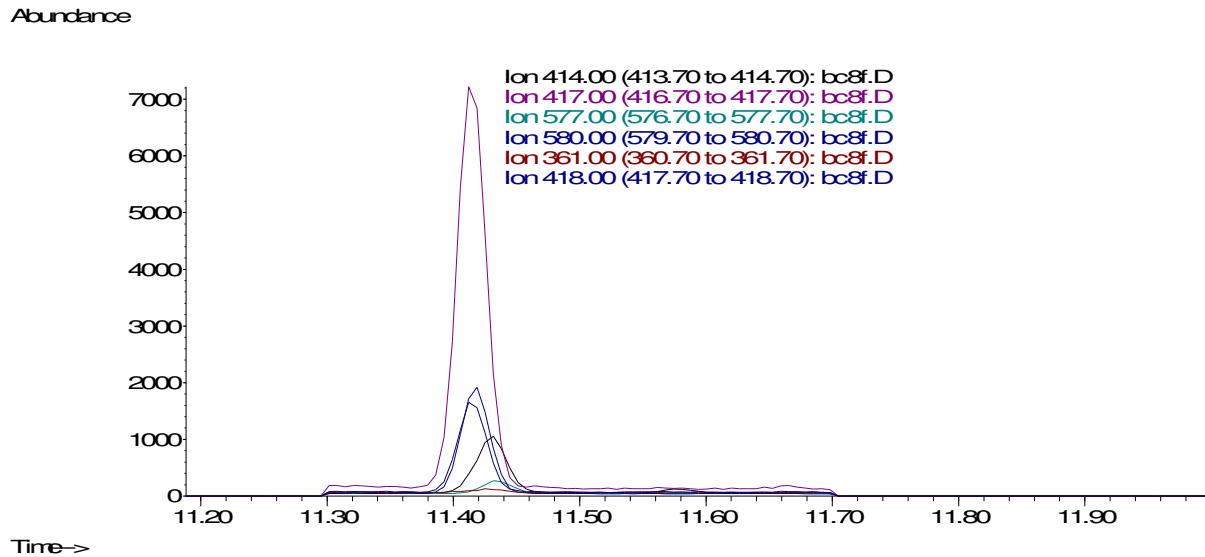


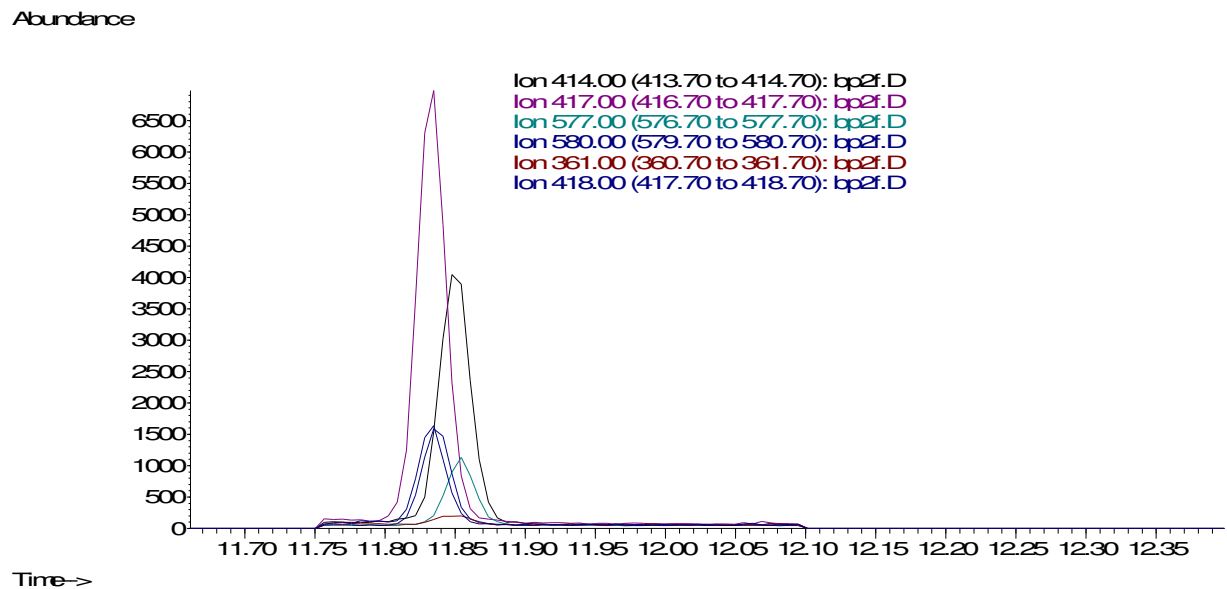
Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Ionen (m/z): das Targetpaar (m/z=577/580) wurde zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze benutzt, das schwächste Qualifierpaar (m/z=361/418) zur Ermittlung der Nachweisgrenze. Das zweite Qualifierpaar (m/z=414/417) wurde nicht in die Bestimmung der analytischen Grenzwerte miteinbezogen.

	Target	1.Qualifier	2.Qualifier
Morphin	577	361	414
Morphin-d3	580	418	417

In folgender Darstellung ist ein SIM-Chromatogramm eines Serums zu sehen, bei dem freies Morphin nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden konnte (Konzentration ist größer als die Nachweisgrenze, aber kleiner als die statistisch errechnete Bestimmungsgrenze).



Ein SIM-Chromatogramm eines Serums mit einer Morphinkonzentration von 13,6 ng/ml:



C. Methodenvalidierung

Formeln

Wiederholpräzision

- Berechnung der Wiederholvarianz

$$s_r^2 = MS_{wg}$$

$$s_r^2 \quad \text{Wiederholvarianz}$$

$$MS_{wg} \quad \text{Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppe}$$

- Berechnung der Wiederholpräzision aus der Wiederholvarianz

$$RSD_r [\%] = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100 = \frac{\sqrt{MS_{wg}}}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$RSD_r \quad \text{Wiederholpräzision}$$

$$s_r^2 \quad \text{Wiederholvarianz}$$

$$\bar{x} \quad \text{Mittelwert aller Bestimmungen}$$

$$MS_{wg} \quad \text{Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppe}$$

Tagesverschiedene Laborpräzision

- Berechnung der Varianz zwischen den Tagen

$$s_t^2 = \frac{MS_{bg} - MS_{wg}}{n}$$

$$s_t^2 \quad \text{Varianz zwischen den Tagen}$$

$$MS_{bg} \quad \text{Mittleres Abweichungsquadrat zwischen den Gruppen}$$

$$MS_{wg} \quad \text{Mittleres Abweichungsquadrat innerhalb der Gruppen}$$

$$n \quad \text{Anzahl der Wiederholbestimmungen pro Tag}$$

- Berechnung der tagesverschiedenen Laborpräzision

$$RSD_{(t)}[\%] = \frac{\sqrt{s_t^2 + s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100$$

$RSD_{(t)}$ tagesverschiedene Varianz

s_t^2 Varianz zwischen den Tagen

s_r^2 Wiederholvarianz

\bar{x} Mittelwert aller Bestimmungen

Auszug aus dem Programm „Valistat“

Im Folgenden wird die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Morphin als Beispiel der Methodenvvalidierung mit dem Programm Valistat aufgeführt. Die Bestimmung der analytischen Grenzwerte erfolgte nach DIN 32654 aus Kenndaten der Kalibrationsgeraden. Für Serie 3 ist dies beispielhaft ausgedruckt (siehe nächste Seite). Der Bereich der Kalibrationsgeraden beschränkte sich auf die Konzentrationen in der Nähe der Grenzen, da nur so eine Varianzenhomogenität über den Kalibrationsbereich möglich war.

Die Berechnung der Nachweisgrenze mit dem nachweisschwächsten Qualifierpaar war bei einem Signifikanzniveau von 90 % erfolgt. Hierbei ließen sich zwar wesentlich kleinere Nachweisgrenzen berechnen, jedoch würde auch das Risiko für falsch positive Ergebnisse steigen. Die Berechnung der Bestimmungsgrenze erfolgte mit dem Targetpaar bei einem Signifikanzniveau von 99%. Die Prüfung auf Ausreißer erfolgte mit dem Ausreißer-F-Test.

Weiterhin erfolgte eine Regressionsanalyse und der Linearitäts-Mandel-Test.

Über 6 Serien wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für Morphin in Konzentrationen zwischen 0 und 20 ng/mL bestimmt. Die arithmetischen Mittel dieser Werte wurden als Grenzwerte für den Essversuch übernommen.

Im Folgenden sind ein Valistat Ausdruck der Grenzwerte von Serie 3 sowie eine Zusammenfassung der Werte und der arithmetischen Mittel aufgelistet.

Valistat Ausdruck der Grenzwerte von Serie 3

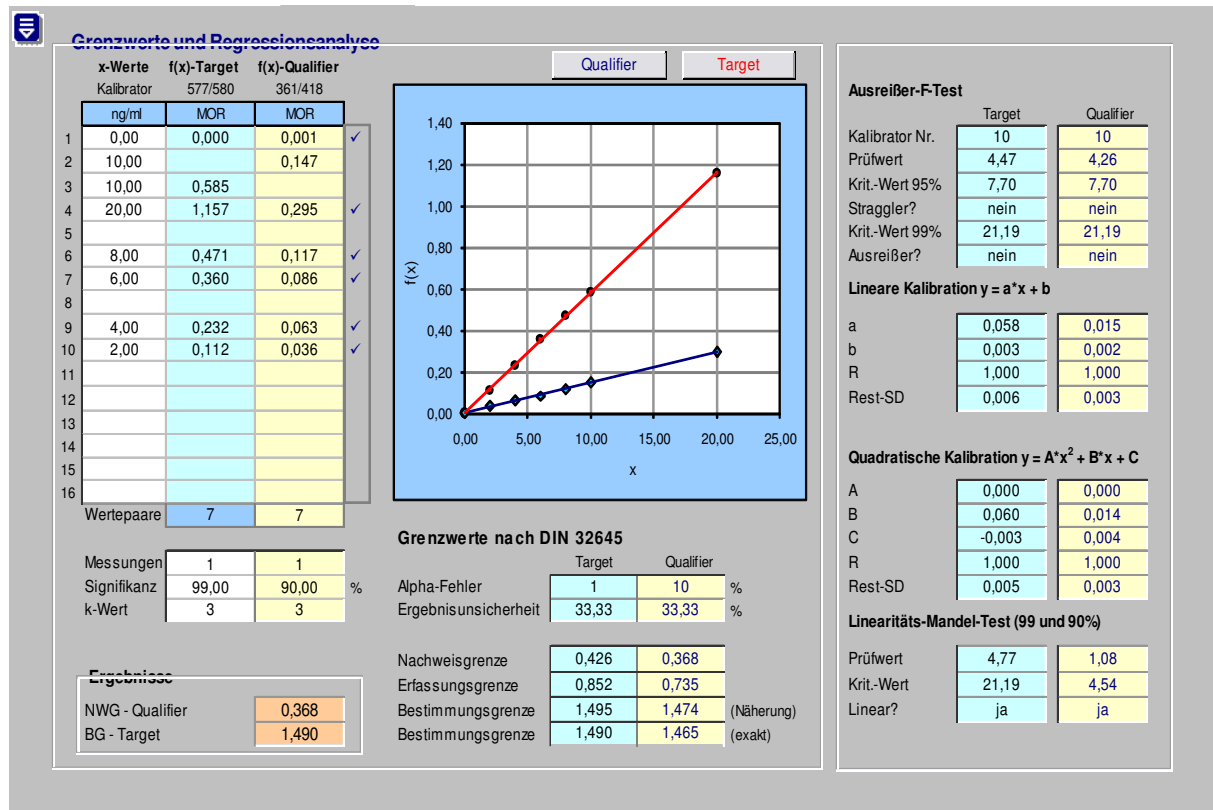


Tabelle 2: Übersicht der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Morphin aus den Serien 1-6, sowie Bildung der Mittelwerte; In Serie 2 wurde der schraffierte Wert der Bestimmungsgrenze nicht in die Mittelwertberechnung miteinbezogen, weil der für die Bestimmungsgrenze errechnete Wert kleiner als der für die Nachweisgrenze errechnete Wert war. So etwas kann passieren, wenn Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze wie hier über verschiedene Ionenpaare und/oder bei unterschiedlichen Signifikanzen ermittelt werden.

Morphin	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5	Serie 6	Mittel
NWG	0,845	0,753	0,366	0,761	1,186	0,497	0,73466667
BG	2,611	0,605	1,492	3,216	2,918	3,861	2,8196

D. Ethikantrag

**Universitätsklinikum S-H; Campus Kiel
Kiel
Institut für Rechtsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. M. Oehmichen**

**Arnold-Hellerstr.12, 24105
Postf. 4325, 24042 Kiel
Tel.: (0431) 597-3600/01**

Kiel, 18. Dezember 2003

Herrn Prof. Dr. J. Schaub
Vorsitzender der Ethikkommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel
Schwanenweg 20
24105 Kiel

Wissenschaftliches Projekt
„Bestimmung der Morphinkonzentration im Blut nach Verzehr mohnsamenhaltiger
Lebensmittel“

Sehr geehrter Herr Professor Schaub,

am Institut für Rechtsmedizin ist unter meiner Leitung geplant, die Morphinkonzentration im Blut nach Aufnahme von mohnsamenhaltigen Backwaren (Mohnkuchen) zu bestimmen, da es Hinweise darauf gibt, dass es nach Aufnahme von mohnsamenhaltigen Lebensmitteln zu positiven Opiat-Bestimmungen im Blut kommen kann.

Prof. Dr. med. M. Oehmichen

E. Versuchsprotokoll

Wissenschaftliches Projekt

„Bestimmung der Morphinkonzentration im Blut nach Verzehr mohnsamenhaltiger Lebensmittel“

Versuchsprotokoll:

Projektleiter:

Prof. Dr. med. M. Oehmichen (Direktor des Instituts für Rechtsmedizin im Universitätsklinikum, Campus Kiel)

Mitarbeiter:

- Frau Dr. rer. nat. G. Rochholz,
- Dr. rer. nat F. Westphal
- Dr. rer. nat. H.W. Schütz
- U. Wiesbrock, Arzt
- Frau cand. med. A. Leinenkugel
- Herr cand. med. D. Gheorghiu

Notwendigkeit der Untersuchung:

Nach § 24a StVG handelt ordnungswidrig, wer unter der Wirkung von z.B. Morphin oder Heroin im Straßenverkehr ein Kraftfahrzeug führt.

Von einer „Wirkung“ wird ausgegangen, wenn Morphin im Blut nachgewiesen wird.

Allerdings liegt dann keine Ordnungswidrigkeit vor, wenn Morphin aus der bestimmungsgemäßen Einnahme eines für einen konkreten Krankheitsfall verschriebenen Arzneimittels herrührt. Ein Nachweis von freiem Morphin im Blut nach Verzehr mohnsamenhaltiger Lebensmittel hätte erhebliche Auswirkungen auf die Anwendbarkeit des § 24a StVG.

Aufgrund von glaubhaften Einlassungen in verschiedenen Fällen, keine Drogen sondern lediglich Mohnsamenprodukte konsumiert zu haben, wurden bereits orientierende Untersuchungen zum Opiatgehalt im Urin durchgeführt.

Bei diesen Untersuchungen wurden auch einzelne Blutproben analysiert, in denen Morphin im Blut nach Mohnsamenkonsum nachgewiesen wurde. Damit bedürfen diese Befunde aufgrund der immensen rechtlichen Relevanz der weiteren gezielten Abklärung.

Projektziel:

In der geplanten Untersuchung soll geprüft werden, ob und in welcher Konzentration Morphin zeitabhängig nach der Aufnahme von handelsüblichem Mohnkuchen nachgewiesen werden kann. Unter Einbeziehung des in dem Mohnkuchen bestimmten Morphingehalts sind die Ergebnisse zur Beurteilung von Opiat-positiven Blutproben bei vermutetem Verstoß gegen § 24a StVG erforderlich.

Projektdurchführung

Es ist beabsichtigt, 20 volljährige Probanden (Medizinstudenten/Kommilitonen/Kommilitoninnen) in die Studie einzubeziehen, die in keinerlei Abhängigkeitsverhältnissen zum Projektleiter stehen. Alle Probanden verzehren zum gleichen Zeitpunkt (12.00 Uhr) eine definierte Menge Mohnkuchen. Dazu werden die Probanden in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die eine Gruppe (15 Probanden) den Mohnkuchen als Nachtisch eines Mittagessens zu sich nimmt, die zweite Gruppe (5 Probanden) mindestens 3 Stunden vor Beginn des Mohnkuchenverzehr nichts gegessen hat. Den Studenten wird direkt vor dem Verzehr des Mohnkuchens ein Venen-Verweil-Katheter am Unterarm gelegt und daraus vor dem Verzehr des Mohnkuchens erstmalig 10 ml Blut abgenommen. Im Folgenden werden die Probanden drei Stücke Mohnkuchen ohne größere Pausen zu sich zu nehmen. Die Probanden bleiben unter Aufsicht, wobei in den ersten 4 Stunden jeweils stündlich 10 ml Blut entnommen wird und in den folgenden 4 Stunden jeweils zweistündlich 10ml Blut entnommen wird. Nach der achten Blutentnahme wird der Venen-Verweil-Katheter entfernt. Am folgenden Tag ist geplant genau 24 Stunden nach Projektstart noch einmal 10 ml Blut durch einmalige Venenpunktion zu entnehmen.

Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienbeteiligung:

Einschlusskriterien für Probanden

- ° volljährige Probanden beiderlei Geschlechts, die sich freiwillig an dem Versuch beteiligen.
- ° Bei den Probanden ist keine Gerinnungsstörung bekannt und es besteht keine Neigung zur Thrombose
- ° Die Probanden stehen unter keiner immunsuppressiven Medikation
- ° bestehende Einwilligungsfähigkeit bei der Aufnahme (Feststellung durch den versuchsleitenden Arzt)

Abbruch der Studienbeteiligung

- ° Komplikationen bei der Blutentnahme
- ° jederzeitige Beendigung auf Wunsch des Probanden

Untersuchungsmethodik und Datenregistrierung

Die Blutproben werden mit einem auch in der Routineanalytik eingesetztem Standardverfahren nur auf die Anwesenheit von freiem und gebundenen Morphin, sowie auf weitere Opioidalkaloide (Codein, Noscapin, Meconin, Papaverin, Thebain) untersucht.

Dazu werden die Proben nach Zugabe deuterierter Standards und nach geeigneter Festphasenextraktion und Derivatisierung mit PFPA/PFPOH mittels GC-MS im SIM-Modus analysiert.

Die Blutproben werden anonymisiert bearbeitet, d.h. die Erhebung der Daten und die Auswertung erfolgen ohne Angaben personenbezogener Daten wie Name und Geburtsdatum.

Alle Probanden erhalten zu Beginn der Untersuchung eine studieninterne Bezeichnung, die im weiteren Verlauf ausschließlich (also ohne Bezug auf die Identität) verwendet wird.

Die Probanden werden vor Beginn des Versuchs schriftlich aufgeklärt und können die Studie ohne Angabe von Gründen jederzeit abbrechen.

Das bei den Untersuchungen übrig gebliebene Probenmaterial wird nach Abschluss der Untersuchung vernichtet.

Risiken und Schutzmaßnahmen

Komplikationen könnten bei den Probanden bei der Blutentnahme entstehen . Dabei kann es zu einer Unterblutung/ Hämatom oder Thrombosebildung kommen. Auch bakterielle Infektionen könnten als Komplikation auftreten. Diese Komplikationen sind jedoch extrem selten, gut behandelbar und in der Regel ungefährlich.

Die Blutentnahme der Probanden wird unter Aufsicht eines Arztes durchgeführt, der bei eventuell auftretenden Komplikationen den Probanden von der Studie ausschließt, wobei eventuell erforderlich werdende Behandlungsmaßnahmen sichergestellt sind. Weiterhin besteht während der gesamten Versuchsdauer eine ärztliche Überwachung.

In Anbetracht der Ungefährlichkeit einfacher Blutentnahmen erscheint eine Versicherung der Probanden entbehrlich.

Dieser Antrag ist bisher bei keiner anderen Ethik- Kommission gestellt worden.

F. Aufklärungsbogen

Wissenschaftliches Projekt „Bestimmung der Blutmorphinkonzentration nach Verzehr mohnsamenhaltiger Lebensmittel“

Aufklärungsbogen (Proband/Probandin)

Sehr geehrte Versuchsteilnehmerin, sehr geehrter Versuchsteilnehmer,
Sie sind bereits von uns angesprochen worden, wir möchten Sie hiermit schriftlich um
Mithilfe bei einem wissenschaftlichen Projekt bitten.

Wer sind wir?

Wir sind eine wissenschaftliche Arbeitsgruppe am Institut für Rechtsmedizin des
Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel. Falls Sie mit uns persönlich Kontakt aufnehmen
möchten stehen Ihnen der Projektleiter Prof. Dr. med. M. Oehmichen, Frau Dr. rer. nat. G.
Rochholz bzw. Dr. med. U. Wiesbrock gerne für ein Gespräch zur Verfügung (0431/5973600
oder-3606).

Welches sind die Ziele unseres wissenschaftlichen Projektes?

Ein Nachweis von freiem Morphin im Blut nach Verzehr mohnsamenhaltiger Lebensmittel
hätte erhebliche Auswirkungen im Hinblick auf die Anwendbarkeit des § 24a StVG. Danach
handelt ordnungswidrig, wer unter der Wirkung z.B. von Morphin oder Heroin im
Straßenverkehr ein Kraftfahrzeug führt. Von einer Wirkung wird ausgegangen, wenn
Morphin im Blut nachgewiesen wird. Wir wollen überprüfen ob sich nach Verzehr
mohnsamenhaltiger Lebensmittel (Mohnkuchen) freies Morphin im Blut nachweisen lässt. Es
ist beabsichtigt, 20 Probanden (Medizinstudenten/Kommilitonen/Kommilitoninnen) in die
Studie einzubeziehen. Alle Probanden verzehren zum gleichen Zeitpunkt (12.00 Uhr) eine
definierte Menge Mohnkuchen.

Dazu werden Sie in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die eine Gruppe (15 Probanden) den
Mohnkuchen als Nachtisch eines Mittagessens zu sich nimmt, die zweite Gruppe (5
Probanden) mindestens 3 Stunden vor Beginn des Mohnkuchenverzehr nichts gegessen hat.
Ihnen wird direkt vor dem Verzehr des Mohnkuchens ein Venen-Verweil-Katheter am
Unterarm gelegt und daraus vor dem Verzehr des Mohnkuchens erstmalig 10 ml Blut
abgenommen. Im Folgenden werden Sie drei Stücke Mohnkuchen ohne größere Pausen zu
sich zu nehmen. Sie bleiben dann unter Aufsicht, wobei in den ersten 4 Stunden jeweils
stündlich 10 ml Blut entnommen wird und in den folgenden 4 Stunden jeweils zweistündlich
10ml Blut entnommen wird. Nach der achten Blutentnahme wird der Venen-Verweil-
Katheter entfernt. Am folgenden Tag ist geplant genau 24 Stunden nach Projektstart noch
einmal 10 ml Blut durch einmalige Venenpunktion von Ihnen zu entnehmen. Insgesamt
handelt es sich dabei um 8 Blutentnahmen mit jeweils 10 ml Blut mit einem Endvolumen von
80 ml. Dies würde ca. 4-5 Esslöffeln entsprechen.

Mögliche Komplikationen:

Die Blutentnahme stellt das einzige Risiko dar:

Es kann beim Legen eines Venen-Verweil-Katheters bzw. durch wiederholte Blutentnahmen zu leichten Unterblutungen an der Einstichstelle kommen, wie auch zur Thrombenbildung(d.h. Verlegung eines Blutgefäßes durch ein Blutgerinnsel). Weiterhin kann es durch die Blutentnahme zu bakteriellen Infektionen kommen. Diese Komplikationen sind als äußerst selten einzustufen und gut behandelbar.

Eine bekannte Gerinnungsstörung oder eine erhöhte Thromboseneigung, genau so wie eine Immunsuppression führen zu einem erhöhtem Risiko, so dass diese Dispositionen zum Ausschluss von der Studie führen.

Datenschutz:

Die Angaben zu den Blutproben werden anonymisiert bearbeitet, d.h. die Erhebung der Daten und die Auswertung erfolgen ohne Angaben personenbezogener Daten wie Name und Geburtsdatum. Ein späterer Rückschluss auf Ihre Person ist daher ausgeschlossen. Falls Sie etwas nicht verstanden haben oder genauere Auskünfte über Einzelheiten wünschen, fragen Sie bitte vor Beginn des Projektes.

G. Einverständniserklärung

Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel
Institut für Rechtsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. M. Oehmichen

Arnold-Hellerstr.12, 24105Kiel
Postf. 4325,24042 Kiel
Tel.: (0431) 597-3600/01

*„Wissenschaftliches Projekt“
„Bestimmung der Morphinkonzentration im Blut nach Verzehr mohnsamenhaltiger
Lebensmittel“*

Einverständniserklärung (Proband/Probandin)

Ich nehme freiwillig an einer Untersuchung des Institutes für Rechtsmedizin an dem Universitätsklinikum S-H, Campus Kiel teil, bei der die Morphinkonzentration im Blut nach Verzehr von mohnsamenhaltigen Lebensmitteln (Mohnkuchen, Joghurt usw.) gemessen wird. Dazu wird mir nach Verzehr des Mohnkuchens nach der ersten Stunde, nach der zweiten, nach 3,5 Std. und nach 6 Std. jeweils eine Blutprobe von jeweils 10 ml entnommen. 24 Stunden nach Beginn der Versuchsreihe wird mir dann erneut eine letzte Blutprobe von 10 ml entnommen.

Insgesamt handelt es sich dann um 5 Blutproben mit einem Gesamtvolumen von 50 ml (entspricht ca. 2-3 Esslöffeln), die mir abgenommen werden. Die Abnahme des Blutes erfolgt mittels Venenpunktion. Weiterhin gebe ich nach 15 min, 30min, 60 min, 90 min, 120 min und nach 4 und 8 Std. jeweils eine Speichelprobe von ca. 1,5 ml ab. Weiterhin werde ich vor Beginn des Versuchs eine Urinprobe abgeben und im weiteren Verlauf des Versuchs mir mögliche Urinproben abgeben. Das Blut, die Speichel- und die Urinproben werden dann auf freies und gebundenes Morphin, sowie auf weitere Opioidalkaloide (Codein, Noscapin, Meconin, Papaverin, Thebain) untersucht. Bei der Datenauswertung wird kein Rückschluss auf meine Person möglich sein, da zur Probenkennzeichnung keine personenbezogenen Daten wie Name und Geburtsdatum verwendet werden und damit auch nicht zu einem späteren Zeitpunkt erscheinen können.

- ° Ich nehme freiwillig an dem Versuch teil. Es besteht keine Abhängigkeitsbeziehung zum Projektleiter
- ° Ich bin darüber informiert, dass die Erhebung und Auswertung der Blut -, Speichel- und Urinproben im Zusammenhang mit meinen Daten ausschließlich anonym erfolgt.
- ° Mir sind keine Gerinnungsstörungen/ Thromboseneigungen bekannt; weiterhin ist mir keine Immunsuppression bekannt

- Ich bin darüber unterrichtet worden, dass ich jederzeit ohne Angaben von Gründen von der Untersuchung zurücktreten kann, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen. Die Untersuchung endet ebenfalls, wenn Komplikationen auftreten sollten.
- Zu der Untersuchung habe ich ausführliche Informationen erhalten und meine Fragen wurden ausreichend beantwortet.
- Den Inhalt des Aufklärungsbogens habe ich verstanden
- Ein Formular des Aufklärungsbogens und die Zweitschrift der Einwilligungserklärung wurden mir ausgehändigt

Name_____

Adresse_____

Ort, Datum

Unterschrift des Probanden

Einwilligungsfähigkeit und Informiertheit des Probanden festgestellt:

Ort, Datum

Unterschrift des versuchsbegleitenden Arztes (U. Wiesbrock)

8. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. jur. Dr. med. Kaatsch, Herrn Prof. Dr. med. M Oehmichen und Frau Dr. rer. nat. Rochholz für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. rer. nat. Schütz und Herrn Dr. rer. nat. Westphal danke ich für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten sowie für eine hervorragende Betreuung bei der Einarbeitung in die Labortechnik.

Ein besonderer Dank gilt nochmals Frau Dr. rer. nat. Rochholz für Ihre Anregungen und hilfreichen Hinweise beim Ausarbeiten der Dissertation. Sie hat mir bei frequenten Treffen, die teilweise bis in die frühen Morgenstunden reichten, mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Weiterhin danke ich Herrn Wiesbrock für die Mitwirkung am Versuchsentwurf.

Dankend erwähnen möchte ich noch Dr. Chris Parker, Dr. Jane Beattie, Dr. Elaine Allsop sowie Dr. Colin Williams, die mir nicht nur mit fachlichen Erklärungen in Pharmakokinetik sondern auch mit freien Studientagen den Weg ebneten, die Dissertation zu vervollständigen.

Ich möchte mich auch noch herzlich bei meinen Eltern und Daniel Gheorghiu für die Geduld bei Küchenexperimenten mit Mohnsamen, für das rege Interesse am Stand der Dinge und für die ewig währende Hoffnung auf eine fertiggestellte Arbeit bedanken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Andrea Leinenkugel

geb. am 19.05.1980 in Johannesburg (RSA), ledig

Eltern: Frieder Leinenkugel, geb. am 19.01.1942, Dipl. Ingenieur

Valerie Leinenkugel, geb. Hastie, geb. am 15.02.1950, Hebamme

Schulbildung

Aug. 1986 - Grundschule Pang, Rosenheim
Juni 1990

Sept. 1990 - Karolinengymnasium Rosenheim,
Juni 1999 Abitur

Hochschulbildung und Abschlüsse

Okt. 1999 - Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrecht-
Dez. 2005 Universität zu Kiel

Okt. 2000- Studium der Sportwissenschaften mit Schwerpunkt
Okt. 2003 Sportmedizin an der Christian-Albrecht- Universität zu
Kiel

2003 Ausbildung zum Medizinische Fitnesstrainer,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Dr. M. Sievert, Abteilung der Sportmedizin

Nov. 2003 Doktorand an dem Institut für Rechtsmedizin

Dez. 2005 Abschluss des Studiums mit dem 3. Staatsexamen und
der ärztlichen Approbation

Juni 2006 Examen für "Membership of The Royal College of
Surgeons, Edinburgh", MRCS (Ed) Part 1 and 2

Mai 2008- Examen für "Fellowship of The Royal College of
Jan. 2010 Anaesthetists", (primary FRCA)

Praktisches Jahr:

Okt. 2004 - Jan. 2005

Unfallchirurgie

Groote Schuur, Kapstadt, RSA

Feb. 2005 - Mai 2005

Gynäkologie und Geburtshilfe

Dora Ngiza Hospital, Port Elizabeth, RSA

Juni 2005 - Sep. 2005

Notfallmedizin

St. John's Hospital, Edinburgh, Schottland

Berufserfahrung: Rotation für die Ausbildung in der Notfallmedizin/ Anaesthesie

Feb. 2006 - Aug. 2006

Assistenzärztin (Senior House Officer) der Notfallmedizin,

St. John's Hospital, Edinburgh, Schottland

Aug. 2006 - Feb. 2007

Assistenzärztin der Plastischen und Rekonstruktionschirurgie,

Kinderabteilung des Universitätsklinikums (Sick Childrens Hospital), Edinburgh, Schottland

Feb. 2007- Aug. 2007

Assistenzärztin der Notfallmedizin,

Universitätsklinikum (Royal Infirmary), Glasgow

Aug. 2007- Feb. 2008

Assistenzärztin der Intensiv Medizin,

Universitätsklinikum Aintree, Liverpool

Feb. 2008- Aug. 2008

Assistenzärztin der Anästhesie,

Universitätsklinikum Aintree, Liverpool

Aug. 2008- Feb. 2009

Leitende Assistenzärztin (Registrar) der Notfallmedizin,

Universitätsklinikum Aintree, Liverpool

Feb. 2009- Feb. 2011

Leitende Assistenzärztin (Registrar) der Anaesthesie,

Universitätsklinikum Royal Liverpool

Fortbildungen:

- Radiology Survival Guide in Accident and Emergency
Glasgow, Southern General Hospital, Feb. 2006
- Advanced Life Support
Edinburgh, Astley Ainslie Hospital, Sept. 2006
- Advanced Trauma Life Support
Wishaw General Hospital, Sept. 2006
- Paediatric Emergency Care
Edinburgh, Lister, Nov. 2006
- European Paediatric Life Support
Edinburgh, Lister, März 2007
- Introduction to ITU
Aintree University Hospital, Aug. 2007
- Basic Science Revision Course
Aintree University Hospital, Nov. 2007
- MCQ Course
Aintree University Hospital, Liverpool, Mai 2008
- ADAM Course
Aintree University Hospital, Liverpool, Juni 2008
- Paediatric Emergency Medicine,
Birmingham, Okt. 2008
- London Trauma Conference,
London, Nov. 2008
- Ultrasound guided nerve blocks in children and adults
Liverpool, Oct. 2009
- Mobilisation of the Critically Compromised (MOCC)
Liverpool, Nov. 2009

Veröffentlichungen

Rochholz G., Westphal F., Schütz H.W., Leinenkugel A., Gheorghiu D., (2006) Freies Morphin im Blut nach Mohnsamenverzehr- Bewertung der Ergebnisse einer Studie in Hinblick auf § 24a StVG. In: Pragst F., Aderjan R., (Hrsg) GTFCH Symposium 2005. Verlag Dr Dieter Helm, Heppenheim, S. 99-106

Westphal F, Rochholz G, Leinenkugel A, Gheorghiu D, Schütz HW, (2006) Morphine and Codeine in blood after the consumption of poppy seeds. Blutalkohol 43: 14-27

Präsentationen

Compliance of D-Dimer testing in reference to the Wells-scoring system"
Regionale Fortbildung, Notfallmedizin, St. John's Hospital, Livingston, Aug. 2006

"Full Thickness Skin Graft versus Split Skin Graft"
Regionale Fortbildung der Plastischen Chirurgie, Universitätsklinikum, (Royal Infirmary), Okt. 2006

"Osmotic Tissue Expander - The Initial Edinburgh Experience at RHSC"
Regionale Fortbildung der Plastischen Chirurgie, Kinderkrankenhaus, Edinburgh, Nov. 2006

"Comparison of major burn referrals from SJH with, and RIHE without a Burns-unit on site"
Regionale Fortbildung der Plastischen Chirurgie, Universitätsklinikum (Royal Infirmary), Edinburgh, Jan. 2007

Nachfolgende Themen waren Teil eines Unterrichtsprogrammes für neue Assistenzärzte in Notfallmedizin

„Difficulty in Breathing“
Haus-interner Unterricht für neue Assistenzärzte der Notfallmedizin
Universitätsklinikum Aintree, Liverpool, Aug. 2008

„Trauma Management“
Hausinterner Unterricht für neue Assistenzärzte der Notfallmedizin
Universitätsklinikum Aintree, Liverpool, Okt. 2008

„Obstetric and Gynaecological Emergencies“
Hausinterner Unterricht für neue Assistenzärzte der Notfallmedizin
Universitätsklinikum Aintree, Liverpool, Nov. 2008

„The sick child“
Hausinterner Unterricht für neue Assistenzärzte der Notfallmedizin
Universitätsklinikum Aintree, Liverpool, Dez. 2008

Aktivitäten im klinischen Qualitätsmanagement:

Retro- und prospektive Falluntersuchungen mit dem Ziel, klinische Mängel zu erkennen und zu beheben.

“Pain Incidence Audit”

Anaesthesie, Universitätsklinikum Aintree, Feb. 2008

“Comparison of A&E burns referrals to a burns unit between the Royal Infirmary Hospital Edinburgh(RIHE) without and St. John’s Hospital(SJH) in Livingston with a Burns-Unit on site

Plastische Chirurgie, Universitätsklinikum (Royal Infirmary), Edinburgh, Jan. 2007

“Investigation Guidelines of DVT - the role of D-Dimer testing”

Notfallmedizin, St. John's Hospital, Edinburgh, Aug. 2006

“Osmotic Tissue Expander - The Initial Edinburgh Experience at RHSC”

Plastischen Chirurgie, Kinderkrankenhaus, Edinburgh, Nov. 2006